Aus der Häls-Nasen-Ohren-Klinik
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. K.H. Vosteen

Fraktionierte Bestrahlung xenotransplantierter menschlicher Plattenepithelcarcinome aus dem HNO-Bereich, ein in-situ-Modell auf thymusaplastischen nu-nu-Mäusen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf vorgelegt von

Bernd Affeldt aus Krefeld
und
Günter Albert Kurth aus Kleve

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0048

..... ich persönlich empfinde jedes Mal geradezu eine physische Befriedigung, wenn die Wissenschaft sich mit der Poesie in Einklang befindet.

J. L. Barrault, 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Häls-Nasen-Ohren-Klinik
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. K.H. Vosteen

Fraktionierte Bestrahlung xenotransplantierter menschlicher Plattenepithelcarcinome aus dem HNO-Bereich, ein in-situ-Modell auf thymusaplastischen nu-nu-Mäusen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf vorgelegt von

Bernd Affeldt aus Krefeld

und

Günter Albert Kurth aus Kleve

1982

edruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

er Dekan
er Medizinischen Fakultät
r Universität Düsseldorf
z.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Vosteen

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Vieten

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Vorwort	1
II.	Fragestellung	5
III.	Material und Methode	
	1) Versuchstiere und Tierhaltung	5
	2) Versuchstumoren	6
	3) Histologie	8
	4) Transplantationstechnik	12
	5) Messung der Tumoren	13
	6) Bestrahlung der Tumoren	13
	7) Cytostatika und Bestrahlung	14
	8) Autoradiographie	15
IV.	Versuchsaufbau	17
V.	Ergebnisse	
	1) Wachstumskurven	19
	2) Wachstumskurven im Cytostatika-Zusatzversuch	36
	3) Ergebnisse der Autoradiographie	40
VI.	Diskussion	
	1) Wachstumskurven	41
	2) Dosiseffektkurven	47
	3) Kombinationstherapie	
	a) Versuche mit 5-Fluor-Uracil	52
	b) Versuche mit Bleomycin	54
	4) Histologie	56
VII.	Zusammenfassung	58
VIII.	Literaturverzeichnis	

I. Vorwort

Die heute in der Klinik verwendeten Methoden der Behandlung von Tumoren des HNO-Bereiches erstrecken sich im wesentlichen auf operative Techniken und Bestrahlung. Bei inoperablen Tumoren verfügen wir über kombinierte Verfahren zur palliativen Therapie, die eine Bestrahlung sowie den Einsatz von Cytostatika, z. B. im Sinne einer "Teilsynchronisierung" beinhalten.

Um genaue Aussagen über den zu erwartenden Therapieerfolg zu ermöglichen, entstanden seit den 5o-er Jahren zahlreiche Testansätze, das individuelle Verhalten von Tumoren auf Bestrahlung und Cytostatikabehandlung zu untersuchen. Im Vordergrund standen dabei zunächst in-vitro-Techniken, die sich auf Gewebekulturverfahren stützten und wie sie in dieser Art z. B. von GELLHORN et al. (1954), MURRAY et al. (1954), BIESELE (1954) und HIRSCHBERG et al. (1956) entwickelt wurden. Durch diese wurde es möglich, strahlentherapeutische und cytostatische Effekte an intakten, teilungsfähigen Zellen beurteilen zu können, wobei allerdings die unterschiedliche Anzüchtbarkeit einzelner Tumortypen in der Gewebekultur erheblichen Schwankungen unterworfen war.

Ein weiteres in-vitro-Verfahren waren die von der autoradiographischen Technik ausgehenden sogenannten biochemischen Kurzzeittechniken, die die Anlage einer Gewebekultur verzichtbar machten und vor allem auf VOLM zurückgehen. Diese ermöglichten jedoch nicht eine Beobachtung der explantierten Original-Tumorzellen während mehrerer Zellzyklusphasen. Eine solche Methodik ermöglichte es, nur bedingt Aussagen über die Wirksamkeit verschiedener Cytostatika zu machen, da als Kriterium für die erwünschte Schädigung der Tumorzellen nur die Hemmung auf den Einbau von 3 H-Thymidin bzw. 3 H-Uridin zur Verfügung stand. Zur Austestung von z. B. Mitosehemmern

oder zur Beurteilung von Kombinationstherapien (Cytostatika und Bestrahlung) waren diese Verfahren somit ungeeignet.

Als Konsequenz aus den hier angedeuteten Grenzen und Unzulänglichkeiten der in-vitro-Verfahren entwickelte erstmals HANDLER (1956) Ansätze zur Untersuchung von menschlichen Tumoren in-vivo. Hierbei bediente er sich der heterologen Transplantation von Malignomen auf syrische Goldhamster, deren Immunabwehr durch hohe Kortisongaben unterdrückt wurde. Mit jenen Verfahren ließ sich jedoch nur eine Angehrate der menschlichen Tumoren bis maximal 36 % erzielen. Die Bemühungen der folgenden Jahre zielten hauptsächlich darauf hin, diesen Nachteil des Modelles durch eine Erweiterung der Immunsuppression zu kompensieren. Schließlich gelang es BERENBAUM (1974) durch Thymektomierung seiner Versuchstiere, Ganzkörperbestrahlung sowie Verabfolgung von Antilymphozytenserum die Angehrate der Heterotransplantate auf 75 % zu steigern.

Seit jedoch PANTELOURIS (1968) die erstmals von FLANAGAN (1966) beschriebene Mäusemutante "nude" als thymusaplastisch auswies, erübrigten sich die gesamten aufwendigen und risikoreichen Verfahren der Immunsuppression und führten zu einer Wende im Einsatz von in-vivo-Techniken in der experimentellen Tumorforschung.

RYGAARD und POVLSEN (1969) befaßten sich dann sehr eingehend mit den Problemen der Fortpflanzung der Nacktmaus, die in der damaligen Zeit, bedingt durch ihre immunologischen Defekte, nur eine sehr kurze Lebensspanne hatte. GIOVANELLA (1973) schließlich zeigte, daß durch den Einsatz von Antibiotika als ständigem Futtermittelzusatz die Mäuse so lange am Leben gehalten werden konnten, wie dies für die Durchführung zeitaufwendiger onkologischer Versuche notwendig war.

Die Möglichkeit, durch die Transplantation von Fremdgewebe (v. a. Tumorgewebe) auf die nackte Maus das Wachstumsverhalten

eines Tumors außerhalb des menschlichen Körpers im Zellverband zu erforschen, ergibt sich dadurch, daß diese Tiermutante durch Thymusaplasie in ihrer immunologischen Abwehr stark eingeschränkt ist. Während die Lymphozyten normaler Mäuse zu ungefähr 85 % aus T-Zellen und 15 % aus B-Zellen bestehen, besitzen die nude mice nahezu ausschließlich kleine B-Lymphozyten. Dies bedeutet, daß sie zwar einer - wenn auch begrenzten - humoralen Immunreaktion befähigt sind, da bei einer Reihe von Antigenen die Stimulation von B-Lymphozyten nur durch die Mithilfe von T-Zellen zustande kommt (helper cells), nicht aber zu einer zellulären Immunantwort.

Es wurden von PANTELOURIS (1968) und HAIR (1973) Studien durchgeführt, die Vorgänge, die zur frühzeitigen Degeneration des Thymus bei der nackten Maus führten, sowie die Morphologie und Histologie des fetalen und Neugeborenen-Thymus der Nacktmaus beschrieben.

Sie fanden bei Thymusrudimenten von 14 und 15 Tage alten Nacktmausfeten und bei neugeborenen, schon 35-53 Tage alten Mäusen eine Ansammlung zunehmend dilatierter Vesikel und Kanälchen, begrenzt von epithelähnlichen Zellen, insgesamt frei von Lymphozyten. Die Morphologie der rudimentären Thymuslappen der Nacktmaus erinnert an frühe Entwicklungsphasen anderer inkretorischer Drüsen, so z. B. der Schilddrüse und Formationen von normalen mukoiden und serösen Zellen.

Bei der Beschaffenheit des Thymus der Nacktmaus muß zudem differenziert werden zwischen homozygoten nu/nu-Mäusen und heterozygoten nu/+-Mäusen, deren Thymusgewebe nicht so stark degeneriert ist. Durch die hier kurz aufgezeigten immunologischen Besonderheiten dieser Tierart wurden seit Ende der 60'er Jahre Versuche durchgeführt, die Zellkinetik

und Reaktionsweisen von Tumoren auf verschiedene Behandlungsregime mittels Transplantation auf die Nacktmaus unter in-vivo-Bedingungen zu untersuchen.

So wurden in den letzten Jahren zahlreiche verschiedene Tumoren - z. B. Neuroblastome, Melanome und Ovarialcarcinome auf die Nacktmaus übertragen und studiert. Eine ausführliche Darstellung des Einsatzes von nu/nu-Mäusen als Transplantatträger von Mammacarcinomen findet sich bei BASTERT (1976). Xenotransplantierte Geschwülste aus dem Kopf-Hals-Bereich wurden in größerem Umfang erstmals von LINDENBERGER (1977, 1978) untersucht.

Aus dem oben Gesagten wird deutlich, daß die Frage nach der Reaktion der Tumoren auf die Applikation bestimmter Strahlendosen unter verschiedenen Versuchsbedingungen momentan im Vordergrund steht. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die Zielsetzung unserer Arbeit zu verstehen. Dabei bedienten wir uns zweier Plattenepithelcarcinome unterschiedlichen Differenzierungsgrades aus der Kopf-Hals-Region. In Anlehnung an Behandlungsregime aus der klinischen Praxis, die eine Bestrahlung in Fraktionierung vorsieht, wollten wir bei den Xenotransplantaten nach dem gleichen Schema vorgehen. Da in den meisten palliativen Behandlungsplänen unseres Fachgebietes eine Unterstützung der Strahlenwirkung durch Cytostatikagabe im Sinne einer "Teilsynchronisation" vorgesehen ist, versuchten wir in einem gesonderten Experiment auch dieses auf das Modell der Nacktmaus zu übertragen.

II. Fragestellung

Zusammenfassend lautet die Fragestellung unserer Arbeit folgendermaßen:

1) Welchen Einfluß hat eine fraktionierte Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten unserer beiden xenotransplantierten Tumoren? (regrowth delay essay)
2) Welche histologischen Veränderungen lassen sich nach dieser experimentellen Strahlenbehandlung im Xenotransplantat nachweisen?
3) Führt eine Kombinationstherapie (Bestrahlung und Cytostatika) in diesem in-situ-Modell zu einer wesentlichen Veränderung des Wachstumsverhaltens?

III. Material und Methode

1) Versuchstiere und Tierhaltung

Bei der Transplantation menschlicher Tumoren auf Tiere benutzten wir homocygote (nu/nu) thymusaplastische Mäuse. Wie schon in der Einleitung beschrieben, fehlt ihnen der Thymus und die Durch diesen geprägte zelluläre Immunität, so daß das Anwachsen heterologen Tumorgewebes komplikationsarm vor sich gehen kann.
Die Tiere entstammten der eigenen Zucht (Universität Düsseldorf). Die Haltung der Nacktmäuse erfolgte in Lamina-flow-Geräten (Fa. Altromin) mit Makrolonkäfigeinschüben. Die Einstreu bestand aus staubfreien Holzspänen (Fa. Altromin).
Die Nahrung mußte wegen der verständlicherweise hohen Infektanfälligkeit der Tiere mit einer Kombination antibiotischer Zusätze versehen werden. So wurde dem Trinkwasser, das mit 1N-HCl auf einen ph von 2,5 eingestellt wurde, Oxytetracyclin (Celasin ^{R}, Boehringer), Ampicillin/

Oxacillin (Totocillin R, Bayer), Cephalexin (Oracef R, Lilly) und Kaliumsorbat zugesetzt.
Die Umgebungstemperatur der Tiere war auf 26° C bei einer Luftfeuchtigkeit von 65 % eingestellt.

2) Tumoren

Als Tumoren für unsere Versuche verwendeten wir zwei humane schwachverhornende Plattenepithelcarcinome (Carcinoma spinocellulare) aus dem HNO-Bereich, im weiteren Text als Tumor VOE sowie Tumor JA bezeichnet. Einen kurzen Abriß der klinischen Vorgeschichte gibt folgender Überblick:
Erste Operation des Tumors VOE im Januar 1977 als PE aus oedematöser Schwellung des rechten Taschenbandes mit einem exophytisch wachsenden Tumor im Übergang vom hinteren Drittel zu den vorderen zwei Dritteln. Der Tumor wurde in toto entfernt. Die Histologie ergab eine diffuse Infiltration durch ein atypisches Plattenepithel, das dichtstehende hyperchromatische Kerne mit aufgehobener Schichtung aufwies. An der Oberfläche fanden sich nur wenige Hornperlen. Es wurde die Diagnose eines invasiv verhornenden Plattenepithelcarcinoms des Kehlkopfes gestellt. Drei Wochen später erfolgte Laryngektomie und Neck-Dissection rechts sowie Entnahme eines linksseitigen Lymphknotens in Höhe des Kieferwinkels. Histologisch ergab sich eine tiefe diffuse Infiltration durch das schwachverhornende Plattenepithelcarcinom, der Lymphknoten erwies sich als Metastase. Zwei Monate später wurde in zwei Serien eine Bestrahlungsbehandlung durchgeführt. Die erste Serie umfaßte täglich alternierende Einzelfraktionen von 200 rad bis zu einer Gesamtdosis von 2000 rad je Seite (schnelle Elektronen durch Betatron 20 MeV). Die zweite Serie wurde als

Bestrahlung über tangentiale seitliche Halsstehfelder mit Gammastrahlen (Co-60) in täglichen Fraktionen zu 200 rad je Seite bis zu 2000 rad je Seite durchgeführt. In der Abschlußuntersuchung fanden sich peripher keine vergrößerten Lymphknoten mehr. Fünf Monate später jedoch kam es zu einem submandibulären Rezidiv, welches resiziert wurde. Histologisch reichte das Tumorgewebe bis an die basalen Abtragungsstellen. In den darauffolgenden vier Wochen wurde eine Bestrahlungstherapie in Kombination mit einer Teilsynchronisation vorgenommen. Die Bestrahlung erfolgte wieder mit Gammastrahlen (Co-60) bis zu einer Gesamtdosis von 4000 rad, die Teilsynchronisation wurde mit 5-Fluor-Uracil ^{R}, Roche (2 x 2 Amp. 5-FU, 3 x wöchentlich) durchgeführt. Somit lag die 5-FU-Tagesdosis bei ca. 15 mg/kg/KG. Eine abschließende Röntgenkontrolle zeigte jedoch in der Thoraxübersicht mehrere bis haselnußgroße Rundherde.

Der Tumor JA., der klinisch von vornherein das Bild eines ausgedehnten Speicheldrüsen- und Mundbodencarcinoms links bot, wurde im Juli 1977 exstirpiert, eine Neck-Dissection durchgeführt. Histologisch fand sich ein leicht verhornendes etwas höher differenziertes Plattenepithelcarcinom, als Nebenbefund eine Lymphangiosis carcinomatosa sowie eine große Lymphknotenmetastase. Im darauffolgenden Monat wurde auch bei diesem Patienten eine Kombinationstherapie (Betatron 2 MeV-ultrahärte RÖ-Strahlen bis zur Gesamtherddosis von 4000 rad und 5-FU-Teilsynchronisation nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt.

Somit zeigten beide Tumoren vor der Transplantation alle Kriterien der Malignität, d. h. schnelles, schrankenloses, infiltrierendes und destruktives Wachstum, Metastasierung, Entdifferenzierung und Atypie ihrer Zellen.

3) Histologie

Das histologische Bildmaterial wurde folgendermaßen erstellt:
Von den Tumoren wurde jeweils eine Probe in 8-prozentigem Formalin fixiert. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und anschließender Einbettung in Paraplast (Sherwood) wurden 5 um dicke Serienschnitte erstellt. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin als Gegenfärbung.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen jeweils die Histologie einer Biopsie des entsprechenden Originaltumors.

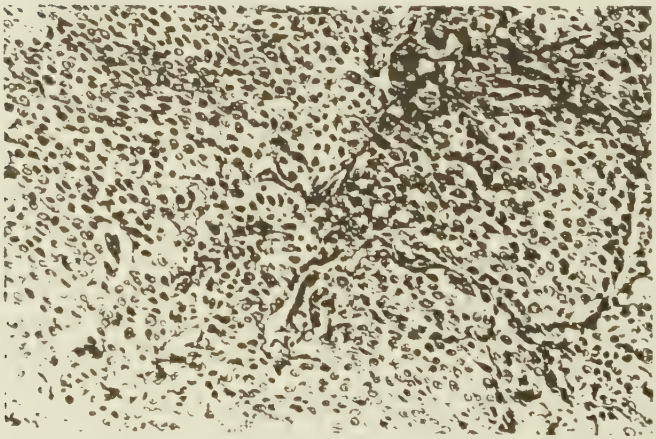


Abb. 1
(Originaltumor VOE)

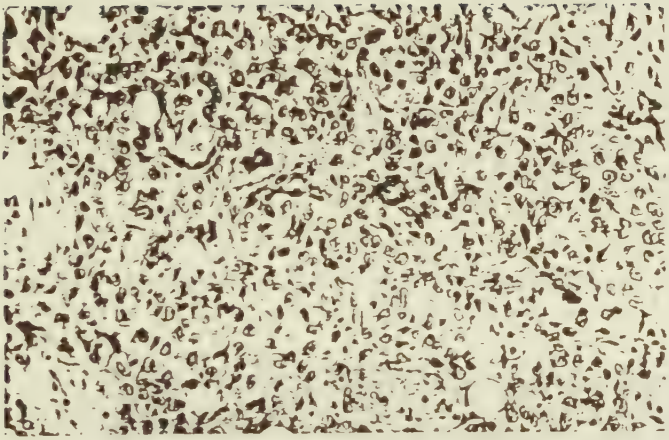


Abb. 2
(Originaltumor JA)

Vergleiche mit den Histologien der xenotransplantierten Tumoren zeigen, daß diese histologisch den Ausgangstumoren weitestgehend ähnlich sind. Diese histologische Kontinuität wird auch über mehrere Tumorpassagen hinweg gewahrt. Als Beispiel dienen die auf der folgenden Seite abgebildeten Histologien der Tumoren VOE und JA, welche frühe und spätere Transplantationspassagen der Xenotransplantate vergleichend gegenüberstellen (Abb. 3 und 4).

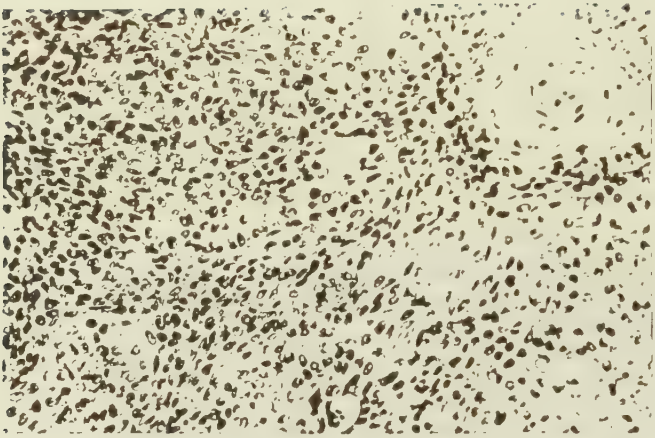


Abb. 3
Histologie des Tumors VOE in der 2. Transplantationspassage

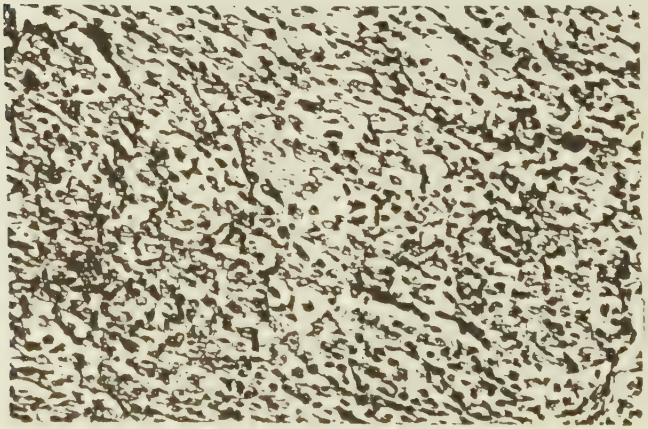


Abb. 4
Histologie des Tumors JA in der 9. Transplantationspassage

RYGAARD und POLVSEN (1971, 1972) beschrieben eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der auf nackte Mäuse transplantierten Tumoren mit den Originaltumoren hinsichtlich ihrer Histologie, ihrer Enzymproduktion, Karyotypie und Ansprechbarkeit auf Cytostatika. Ähnliche vergleichende Untersuchungen wurden vom Zentralinstitut für Tierexperimente Kanageva der Universität Tokio 1976 vorgelegt. Es wurden dort 5 Craniopharyngeome, 2 Plasmocytome, 1 Inselzelltumor, 5 Thymome und 1 Chorioncarcinom untersucht. Gemessen wurde deren Produktion bezüglich HCG, Erythropietien, CRF und Calcium im Serum der Mäuse. Man fand unverändert hohe Hormonproduktionen der Tumoren, d. h. der Serumspiegel der gemessenen Substanzen war, entsprechend dem Produktions/Blutvolumen-Verhältnis bei den Mäusen um ein Vielfaches höher als im menschlichen Serum.

STILES zeigte 1976 ferner, daß transplantierte Tumorzellen ihre ihnen eigene Tumorgenität beibehielten, indem er nachwies, daß auf nu/nu-Mäuse transplantierte Zellreihen, die durch 5-SV40-Virus onkogen transformiert wurden, dort erneut Tumoren ausbildeten, jedoch humane 5-SV40 transformierte Klone, die bekanntermeise auch im menschlichen Wirt keine Tumoren erzeugen, nach der Transplantation auf Nacktmäuse ebenfalls keine Tumorbildung erkennen ließen.

Identität des Wachstumsverhaltens zwischen Originaltumor und Xenotransplantat zeigte auch NIELSEN (1979), indem er auf das gleiche DNA-Verteilungsmuster im exophytisch wachsenden Randbezirk der Originalcarcinome sowie im entsprechenden Transplantattumor hinwies und in beiden an Hand der Histogramme eine gleichmäßige Verteilung von DNA-synthetisierenden Zellen fand.

Neben dieser engen Korrelation der Proliferationskinetik

zwischen Spender- und Transplantattumor wies LINDENBERGER (1981) darauf hin, dass die Xenotransplantate ihre menschlichen Antigencharakteristika beibehalten und ihre individuelle Immunogenität bis in hohe Tierpassagen hinaus bewahren.

4) Transplantation

Zwischen der intraoperativen Entnahme der Tumoren und der Transplantation auf die Maus vergingen nicht mehr als 30 Minuten, wobei sie in dieser Zeit in steriler Nährlösung von 4 ^{o} C transportiert wurden.
Die Übertragung selbst führten wir immer an der gleichen Stelle der lateralen Thoraxwand durch, ganz in der Nähe der Milchleistenstränge. Die vorher steril mit dem Skalpell auf 1 mm Dicke und ca. 2 mm Länge zerkleinerten Tumorstückchen applizierten wir nach sorgfältiger Aussonderung der nekrotischen Anteile mittels Pinzette durch einen Subkutanschnitt mit anschließender Anlegung einer Subkutantasche durch stumpfe Ausweitung an den gewünschten Ort. Die Wundränder wurden sodann primär durch Klammern angenähert. Diese konnten nach 4 - 5 Tagen wieder entfernt werden. Während der Präparation der Tumoren befanden sich diese weiterhin in der sterilen Nährlösung. Bei der Transplantation wurden die Tiere mit Äther narkotisiert.
Zur Anlage weiterer Tumorpassagen töteten wir die Tiere durch Einschläfern mit Äther pro narcosi und entnahmen unter sterilen Bedingungen den Tumor in toto aus der lateralen Thoraxwand der Maus. Nachdem dieser jeweils gründlich von den Resten der bedeckenden Serosa bzw. mäuseeigenen zuführenden Blutgefäßen gereinigt worden war, verfuhren wir nach dem bei der Ersttransplantation beschriebenen Schema. Die Tumorverpflanzung von Maus zu Maus nahm nicht mehr als 15 Minuten in Anspruch.

5) Messung der Tumoren

Ungefähr 10 Tage nach der Transplantation konnten wir bei den meisten Tieren ein Knötchen unter der Haut tasten, das sich durchschnittlich bis zum 14. Tag so weit vergrößert hatte, daß wir mit regelmäßigen Messungen beginnen konnten. Die Messungen erfolgten 3 x wöchentlich. Wir verwendeten dazu eine Schiebelehre und berechneten die Größen unserer Tumoren nach der Formel Länge x 0,5 x Breite x Höhe. Dies entspricht einer Methode wie sie DETHLEFSEN, PREWITT und MENDELSON in ihrer Arbeit aus dem Jahre 1968 vorgeschlagen hatten. Diese einfache Formel kommt den natürlichen Verhältnissen am nächsten, da die subkutan gelegenen Tumoren bis zur Ulcusbildung in ihren Endstadien meist eine halbellipsoide Wachstumsform zeigen. (Volumen eines Halbellipsoids: 4 /3 x L/2 x W/2 x H/2)
In vergleichenden Versuchen das Tumorwachstum in der Zeit rechnerisch festzuhalten, boten z. B. MORRIS und WAGNER (1968) die Formel Länge x Breite an. STEEL, ADAMS und BARRETT arbeiteten 1966 mit dem Produkt aus Länge x Breite. Beide Methoden waren weitgehend durch den langen Zeitraum, der bis zur Verdoppelung der Meßgröße verstreichen mußte, begrenzt und somit weniger präzise. LOONEY zeigte dann 1968, daß die räumliche Darstellung der Tumoren als Halbellipsoide dem wahren G e w i c h t , also der Masse der Tumoren, weitgehend proportional war.

6) Bestrahlung der Tumoren

Die lokale Bestrahlung der Tumoren erfolgte mit einem Röntgengerät der Fa. Siemens (Stabilipan zur Tiefentherapie) bei 200 kV bzw. 2 mA mit einem 0,5 mm Cu-Filter unter Verwendung eines 2-cm-Tubusses. Der Fokus-Hautabstand betrug 25 cm. Zu diesem Zweck fixierten wir die Tiere mit 4 Klammern auf einem beweglichen Kleintierseziertisch.

Für die Fixierung betäubten wir die Tiere mit Äther p. n. Die Einstellung des Tumors im Strahlengang war senkrecht zur Thoraxwand der Maus, was einem Neigungswinkel von ca. 45° zur Horizontalen entsprach. Wie schon in früheren ähnlichen Versuchsanordnungen dosimetrisch ermittelt, beträgt die Abweichung in der Strahlenintensität im Zentrum des Tumors bei verschiedenen Tieren weniger als $\pm$ 5 %. (Einzelheiten zur Bestrahlungstechnik s. VIETEN: Handbuch d. Med. Radiologie, I, 2)

7) Cytostatika und Bestrahlung

Ziel der radiologisch-cytostatischen Kombinationstherapie maligner Tumorerkrankungen ist es, Zellen in einer für Röntgenstrahlen besonders sensiblen Phase zu blockieren und somit eine größere Effektivität bei der Bestrahlung solcher Tumoren zu erreichen.

In unserem als Zusatzversuch durchgeführten Experiment, die Tumorzellen vor der Bestrahlung zu "synchronisieren", wählten wir die Cytostatika Bleomycin und 5-FU.

Bleomycin wurde 1966 als Stoffwechselprodukt von Streptomyces verticillis isoliert und hat klinische Bedeutung vor allem in der Behandlung von Plattenepithelcarcinomen gewonnen. Die Wirkung des Bleomycins besteht darin, daß es in doppelsträngiger DNS Einzelstrangbrüche erzeugt und die so veränderte DNS dann verschiedene DNS-abhängige Polymerasen nicht kompetitiv hemmt. Durch diesen Mechanismus erzielt Bleomycin seine stärkste letale Wirkung in der M- und G-2-Phase des Zellzyclus und arretiert die Tumorzellen in letzterer.

5-FU, eine thyminanaloge Verbindung ist ein weit verbreitetes Cytostatikum, das vor allem in der Therapie solider Tumoren mit niedriger Wachstumsfraktion Verwendung findet. (Erstsynthese 1957 durch Ch. HEIDELBERGER)

5-FU wirkt in der Weise, daß es nach enzymatischer Umwandlung anstelle von Thymin als falscher Baustein in die RNS inkorporiert wird. Für seine cytostatische Wirkung quantitativ bedeutsamer aber ist die Hemmung der Thymidylatsynthetase, die durch sein Reduktionsprodukt 5-Fluor-UMP zustande kommt. Der letale Effekt von 5-FU erstreckt sich über alle Phasen des Zellzyklus. Eine Arretierung von proliferierenden Tumorzellen in einer bestimmten Phase ist fraglich. (DREWS, Grdlg. d. Chemotherapie 1979)
Die bei der klinischen Anwendung der Cytostatika bei Menschen gebräuchliche Dosis rechneten wir auf ein durchschnittliches Mäusegewicht von 25 g um und erhielten so unsere Wirkdosen:

ca. 25 mg/kg/KG 5-FU in 3 Einzelgaben / d
ca. 16 mg/kg/KG Bleo in 3 Einzelgaben / d

In Anlehnung an die beim Patienten heute angewandte Dauerinfusion und unter Berücksichtigung der Zellzyklusdauer der Tumorzellen verabreichten wir den Tieren die in Einzeldosen aufgeteilte Gesamtmenge 12 Stunden vor Bestrahlung in Intervallen zu jeweils 4 Stunden durch intraperitoneale Injektion.

8) Autoradiographie

Um genauere Aussagen über die Verteilung proliferierender und ruhender, also mehr oder weniger strahlensensibler Anteile im Tumor machen zu können, markierten wir 5 Tumoren der Gruppe JA sowie 5 Tumoren der Gruppe VOL radioaktiv in-vivo auf der nackten Maus.
Das Prinzip der Autoradiographie ist es, den Tumorzellen radioaktiv markierte Bausteine zum Einbau in ihre DNA, so z. B. H^3-Thymidin, im Überschuß anzubieten, welche dann während der DNA-Synthesephase von den Tumorzellen

in ihre Chromosomen eingebaut werden. Durch Auflagerung eines photographischen Filmes über das Präparat läßt sich dann die von den Zellkernen ausgesandte ß-Strahlung der Markierungssubstanz, hier des H^3-Thymidins, sichtbar machen. Durch Zuordnung der Filmschwärzungspunkte zu den darunter liegenden Zellen ergibt sich die Möglichkeit, die DNA-synthetisierenden Zellen unter dem Mikroskop zu indentifizieren, quantitativ festzuhalten und somit Markierungsindices (LI = Labelling-Index) zu bestimmen, die das Verhältnis der proliferierenden, aktiven Zellen zur Gesamtheit der Zellen im Tumor bezeichnen. Diese Methode, lebendes Gewebe zu markieren, wurde schon 1924 von LACASSANGE, damals unter Zuhilfenahme von Plutonium, entwickelt (nach AMLACHER 1974), doch erst seit 1951 mit H^3-Thymidin in der oben beschriebenen Weise durchgeführt.

Zur Markierung erhielten die tumortragenden Mäuse eine einmalige intraperitoneale Injektion von 5 µCi H^3-Thymidin pro g Körpergewicht (H^3-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci / mmol, Amersham-Buchler).

Die Markierungen der Tumoren wurden gleichzeitig vorgenommen, um evtl. Tagesschwankungen beim Einbau des Thymidins zu umgehen. Eine Stunde nach Versuchsbeginn wurden die Tiere getötet, die Tumoren sofort entnommen und in thymidingesättigtem, 8-%-igen Formalin fixiert. Diese Fixierung wurde für die Dauer von mindestens 24 Stunden aufrecht erhalten. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Methylbenzoat und Benzol wurden die Proben in Paraplast eingebettet und zu Serienschnitten von 5 um aufgearbeitet. Das Applizieren der Photoschicht nach dem Entparaffinieren wurde mit verdünnter Ilford-Emulsion K 2 (Ciba-Geigy) durch Eintauchen der Proben erreicht ("Dipping"). Nachdem dann die getrockneten

Schnitte für 3 - 4 Wochen in mit $CaCl_2$-beschichteten schwarzen Kunststoffkästen gelagert wurden, konnten danach die Proben mit Amidol entwickelt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden. (Weitere Einzelheiten zur autoradiographischen Technik bei MAURER und SCHULZE, 1968)
Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte unter 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion, wobei pro Gewebeareal 10.000 intakte Tumorzellkerne ausgezählt wurden.

IV. Versuchsaufbau

Die mit den Plattenepithelcarcinomen einseitig besetzten Mäuse der Gruppen VOE und JA teilten wir folgendermaßen auf:

1) Kontrollgruppe zur Ermittlung der durchschnittlichen Tumorvolumenverdoppelungszeit (TVD) der unbestrahlten Tiere:

Tumor VOE	10 Tiere
Tumor JA	10 Tiere

2) Bestrahlung:

Tumor VOE mit 2 x 722 rad:	10 Tiere
Tumor VOE mit 3 x 722 rad:	8 Tiere
Tumor VOE mit 5 x 722 rad:	10 Tiere
Tumor VOE mit 7 x 722 rad:	10 Tiere

3) Zusatzversuch mit Cytostatika:

Tumor VOE mit 7 x 722 rad und Bleomycin:	5 Tiere
Tumor VOE mit 7 x 722 rad und 5-FU:	4 Tiere

4) Bestrahlung:

Tumor JA mit 2 x 722 rad:	10 Tiere
Tumor JA mit 3 x 722 rad:	7 Tiere
Tumor JA mit 5 x 722 rad:	10 Tiere
Tumor JA mit 7 x 722 rad:	10 Tiere

5) Zusatzversuch mit Cytostatika:

Tumor JA mit 5 x 722 rad und Bleomycin:	5 Tiere
Tumor JA mit 5 x 722 rad und 5-FU:	4 Tiere
Tumor JA mit 7 x 722 rad und Bleomycin:	3 Tiere
Tumor JA mit 7 x 722 rad und 5-FU:	4 Tiere

Zu den in der obigen Aufstellung genannten Tierzahlen muß gesagt werden, daß nur solche Tumoren berücksichtigt wurden, die einen verwertbaren Wiederanstieg der Größe nach der Behandlung aufwiesen. Aufgrund des relativ hohen Tierverlustes, z. T. bedingt durch die Absterberate während der langen Versuchsdauer, waren die Tiergruppen im Ansatz natürlich zahlenmäßig weitaus stärker (ca. 20 Stück).

V. Ergebnisse

1) Wachstumskurven

Zur besseren Verdeutlichung des Bestrahlungseffektes ist in den folgenden Abbildungen eine Normalwachstumskurve, d. h. eine arithmetisch gemittelte Summenkurve aus den Wachstumskurven der unbestrahlten Tumoren jeweils als unterbrochen dargestellte Vergleichskurve miteingezeichnet.

Bei der Bestrahlung des Plattenepithelcarcinoms JA mit einer fraktionierten Dosis von 2 x 722 rad ergaben sich folgende Wachstumskurven (Abb. 5, Tumorgröße auf der logarithmisch aufgeteilten Ordinate in ccm):

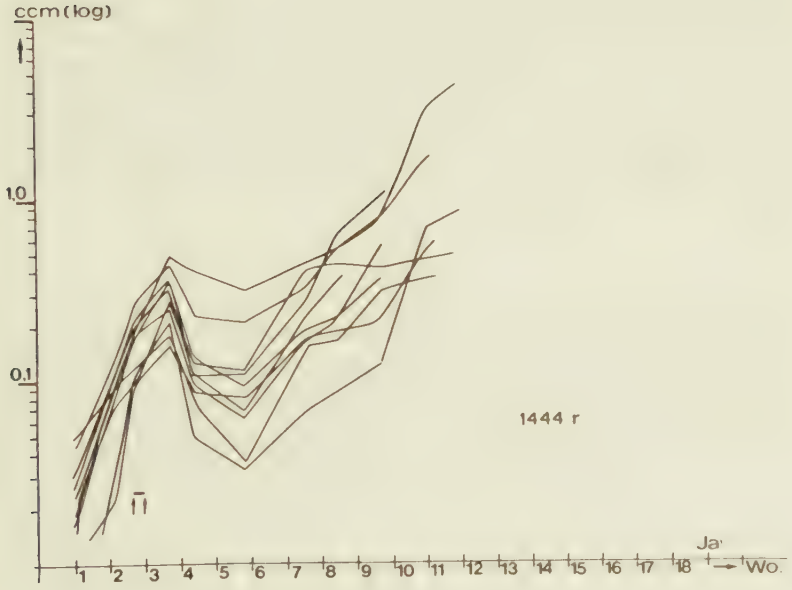


Abb. 5 (2 x 722 rad JA, nicht normierte Einzelkurven)

Da die abgebildeten Tumoren am Tage der ersten Bestrahlung, welcher durch den nach oben zeigenden Pfeil zu Beginn des schwarzen Balkens, der dem Bestrahlungszeitraum entspricht, in der graphischen Darstellung angezeigt wird, in ihrer Größe zwischen 0,1 ccm und 0,5 ccm schwankten, empfahl es sich, die Kurven auf eine einheitliche Ausgangsgröße zu normieren, wobei sich dann die dosisabhängige Strahlenwirkung besser vergleichen ließ (KUMMERMEHR, pers. Mitteilung). Als Ausgangspunkt eignet sich jede beliebige Tumorgröße zum Zeitpunkt des ersten Bestrahlungstages, da nur der darauf folgende Zeitraum für die Strahlenwirkung von Aussagekraft ist. Nach Möglichkeit wählten wir 1 ccm bzw. 0,1 ccm, doch sind grundsätzlich auch andere Volumina möglich, da diese = 100 % gedeutet werden. Die Normierung der einzelnen Meßpunkte erfolgt dermaßen, daß jeder mit dem Faktor "100 : wahre Ausgangsgröße" multipliziert wird. Dieser Rechenvorgang aber entspricht auf dem logarithmischen Maßstab unserer Kurven einer Vertikalverschiebung eines jeden Meßpunktes einer Kurve um den gleichen Betrag. Die Abbildung 6 zeigt die auf eine Tumorgröße von 0,1 ccm normierten Wachstumskurven der Gruppe JA, 2 x 722 rad.

Um das Wachstumsverhalten des Tumors deutlicher hervortreten zu lassen, haben wir von diesen auf eine einheitliche Bestrahlungsgröße normierten Einzelkurven durch arithmetische Mitteilung folgende Summenkurve gewonnen. (Abb. 7)

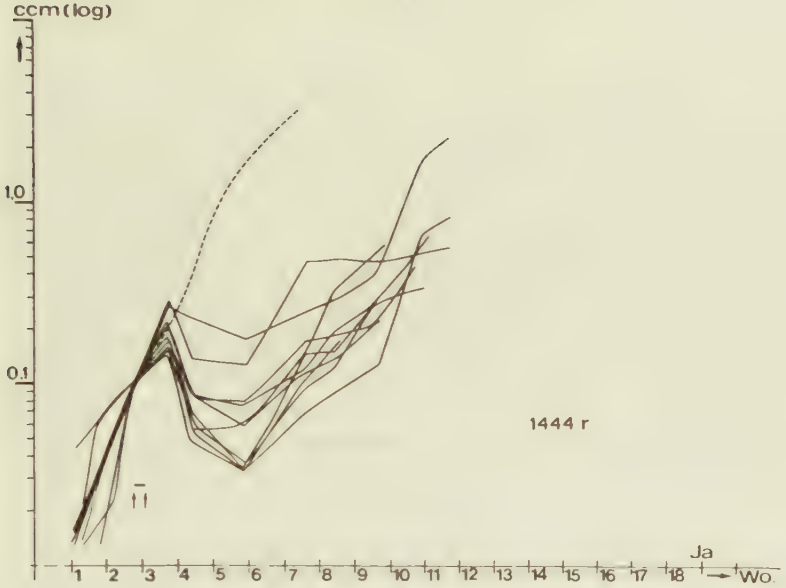


Abb. 6 (2 x 722 rad JA, normierte Einzelkurven)

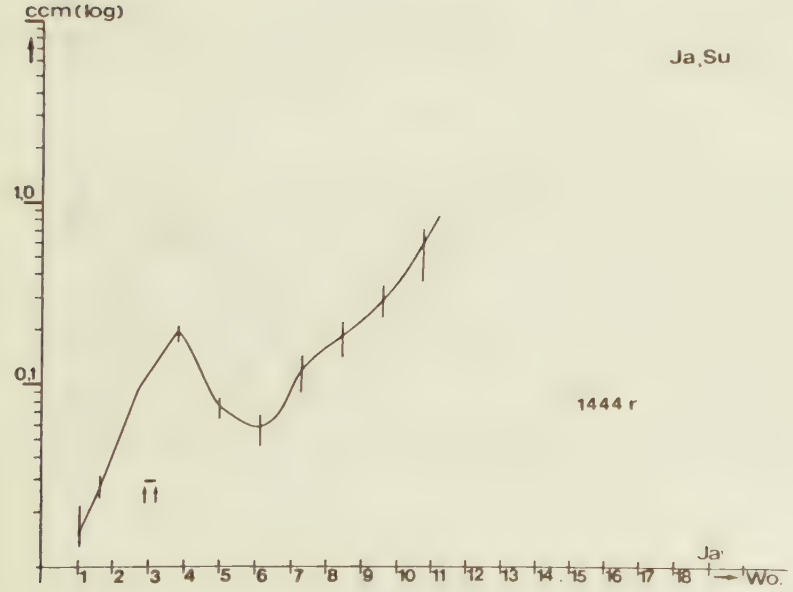


Abb. 7 (2 x 722 rad JA, Summenkurve)

Da die in unseren Versuchen angewandten Strahlendosen überwiegend im subkurativen Bereich lagen, konnte damit gerechnet werden, daß nach einer anfänglichen Volumenabnahme ein Wiederanstieg des Wachstums einsetzen würde. Somit dürfte,wenngleich der Tumor nicht völlig verschwunden war, das erneute Wachstum als Rezidiv in loco bezeichnet werden. Das Wiedererreichen einer vor Bestrahlung festgesetzten Größe kann als Maß für die strahleninduzierte Schädigung der Tumormasse gewertet werden. Diese, in Anlehnung an THOMLINSON und CRADDOCK als Regrowth-delay (= Wachstumsverzögerung) bezeichnete Strahlenreaktion nimmt mit Erhöhung der Gesamtdosis zu. In unserem Fall werteten wir als Regrowth-delay den Zeitraum, den ein Tumor braucht, um nach erfolgter Bestrahlung seine Größe bei Bestrahlungsbeginn erneut zu erreichen. Dieses Intervall läßt sich aus der graphischen Darstellung der Summenkurven leicht abgreifen und beinhaltet somit die sog. "Latenzzeit" (= Zeitraum zwischen 1. Bestrahlung und Wiederanstieg des Wachstums, entsprechend hier Kurvenabfall) und das Rezidivwachstum bis zur oben definierten Größe. Für die fraktionierte Bestrahlung des Tumors JA mit 2 x 722 rad ließ sich somit ein Regrowth-delay von 31,5 Tagen ablesen.

Unter der Erhöhung der Gesamtstrahlendosis auf 2166 rad, appliziert in 3 fraktionierten Bestrahlungen zu je 722 rad, zeigten die Tumoren der Gruppe JA das in Abb. 8 in sieben Einzelkurven dargestellte Wachstumsverhalten.
Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die in vorbeschriebener Weise normierten Wachstumskurven sowie die aus dieser Schar arithmetisch ermittelte Summenkurve (Abb. 9 und 10).

Der Regrowth-delay erfährt jetzt schon eine signifikante Verlängerung auf 56,4 Tage.

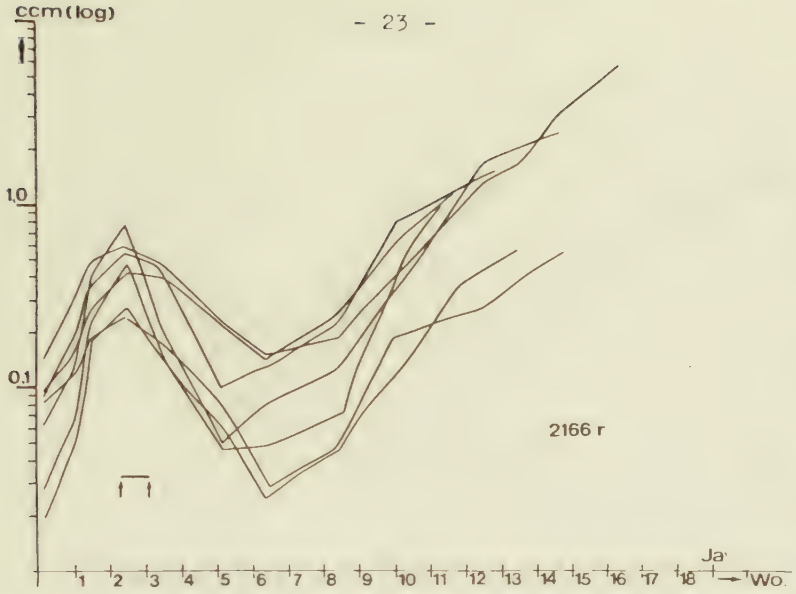


Abb. 8 (3 x 722 rad JA, nicht normierte Einzelkurven)

Abb. 9 (3 x 722 rad JA, normierte Einzelkurven)

Abb. 10 (3 x 722 rad JA, Summenkurve)

Die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen die Einzel- bzw. die normierten Einzelwachstumskurven sowie deren Summenkurve der dritten Gruppe des Tumors JA, die mit einer Gesamtstrahlendosis von 3610 rad, entsprechend 5 Fraktionen zu je 722 rad behandelt wurden. Die Wachstumsverzögerung erfährt eine weitere Steigerung auf 65,3 Tage.

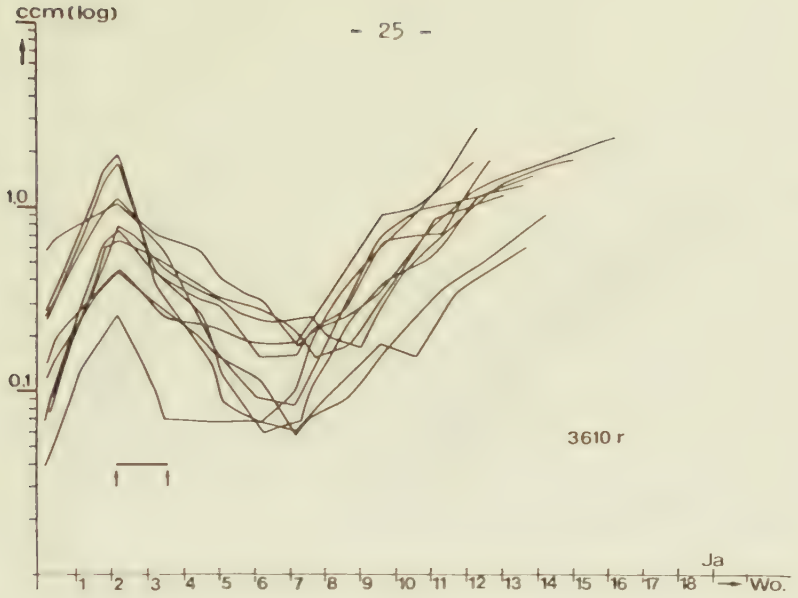
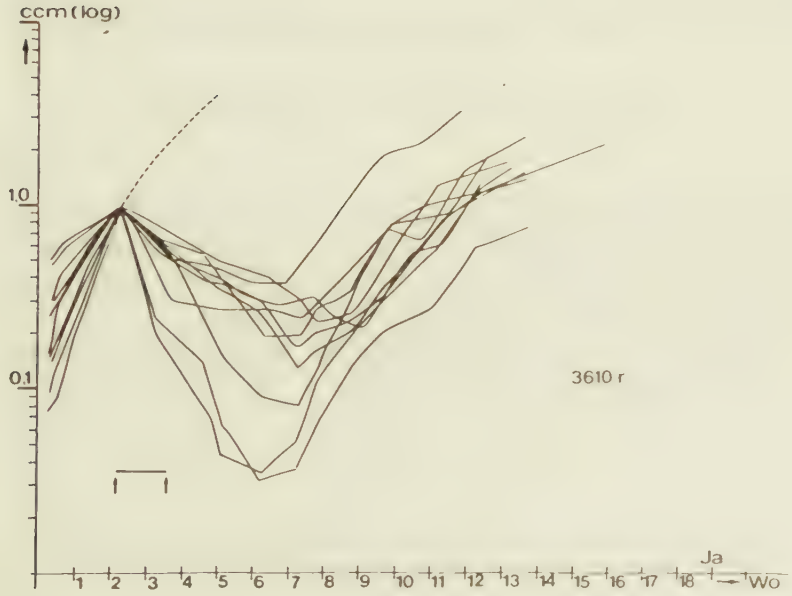


Abb. 11 (5 x 722 rad JA, nicht normierte Einzelkurven)



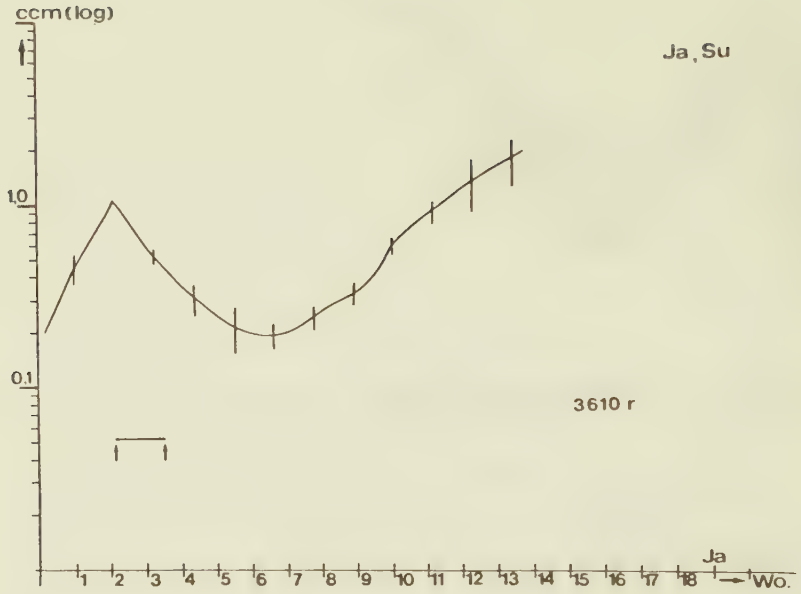


Abb. 13 (5 x 722 rad JA, Summenkurve)

Bei der letzten Gruppe des Tumors JA, die mit insgesamt 5054 rad (= 7 x 722 rad) bestrahlt wurde und in den Abbildungen 14, 15 und 16 dargestellt ist, findet sich keine Änderung des bisher aufgezeigten Verlaufes.
Es findet noch einmal eine deutliche Steigerung der Wachstumsverzögerung auf 96 Tage statt.

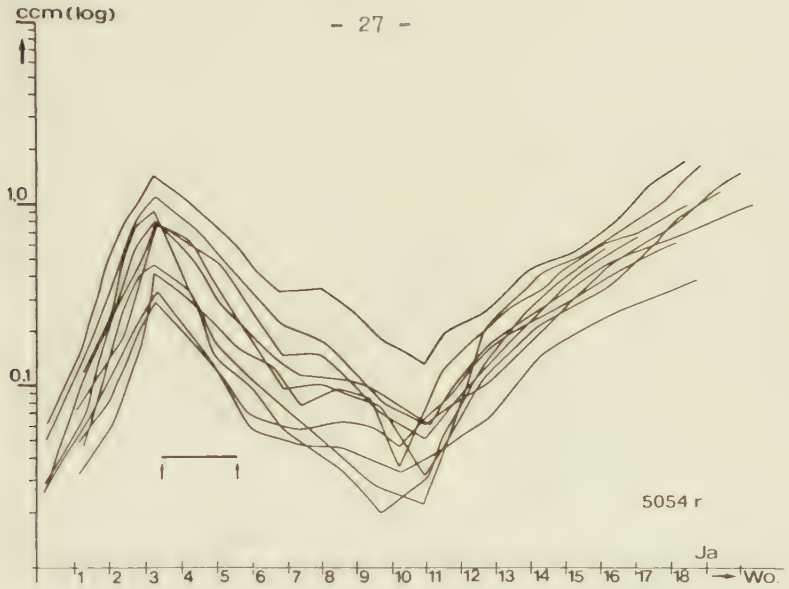


Abb. 14 (7 x 722 rad JA, nicht normierte Einzelkurven)

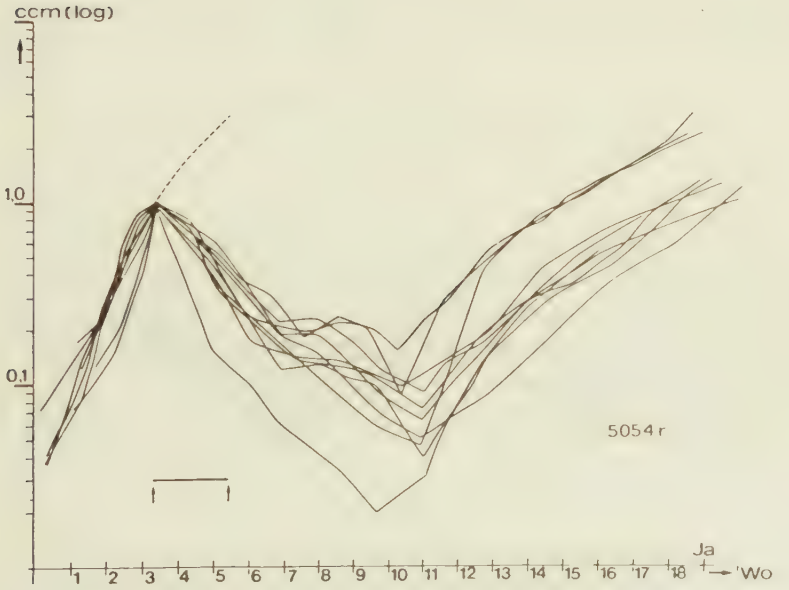


Abb. 15 (7 x 722 rad JA, normierte Einzelkurven)

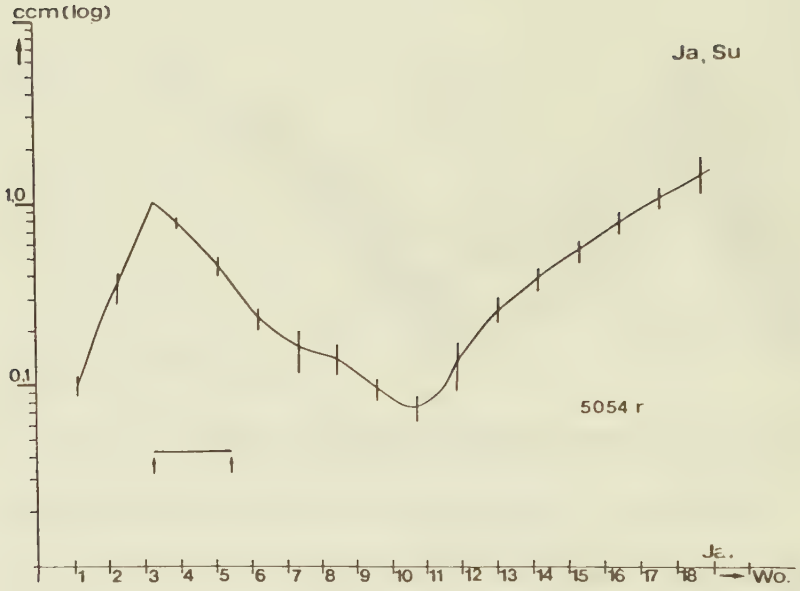


Abb. 16 (7 x 722 rad JA, Summenkurve)

Auf den folgenden Seiten sind die Wachstumskurven (Einzel- und normierte Einzelkurven) des unter den 4 identischen Dosisfraktionierungen bestrahlten, stark verhornenden Plattenepithelcarcinoms VOE sowie deren arithmetisch gemittelte Summenkurven abgebildet.
(Siehe Abbildungen 17 - 28)

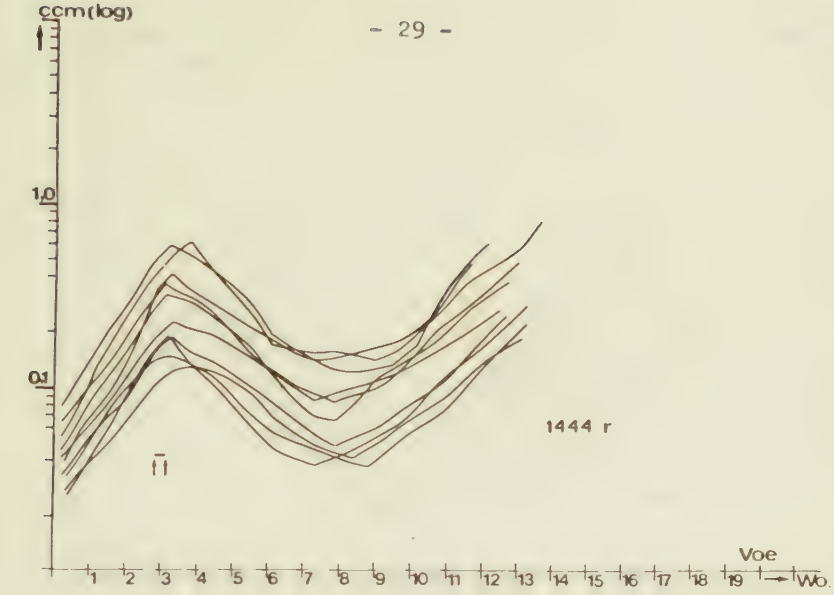


Abb. 17 (2 x 722 rad VOE, nicht normierte Einzelkurven)

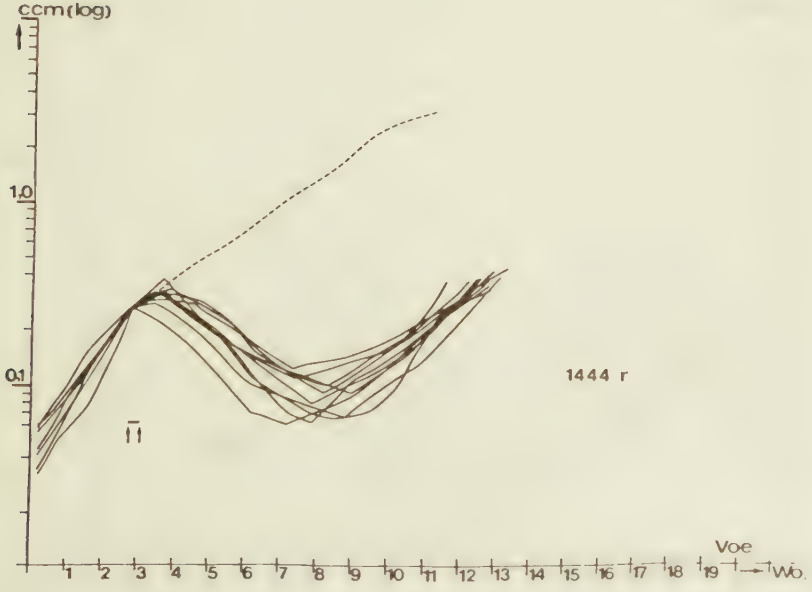


Abb. 18 (2 x 722 rad VOE, normierte Einzelkurven)

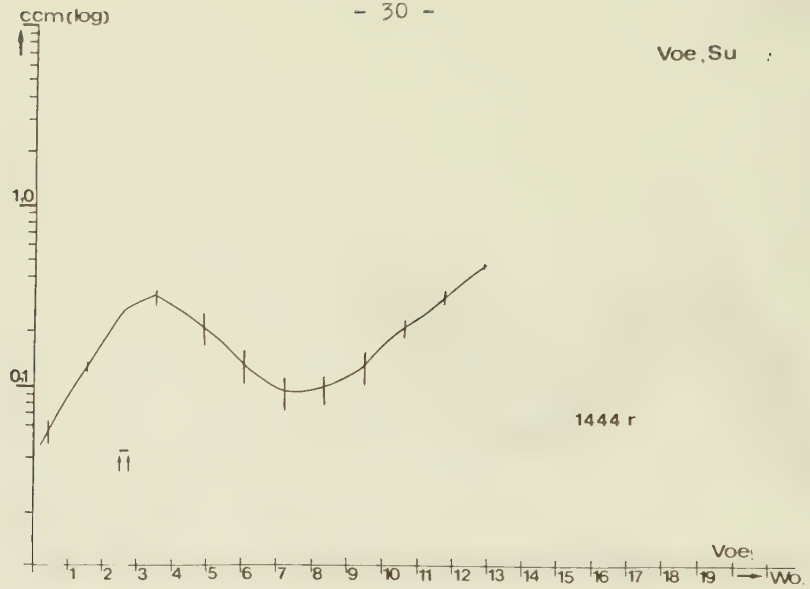


Abb. 19 (2 x 722 rad VOE, Summenkurve)

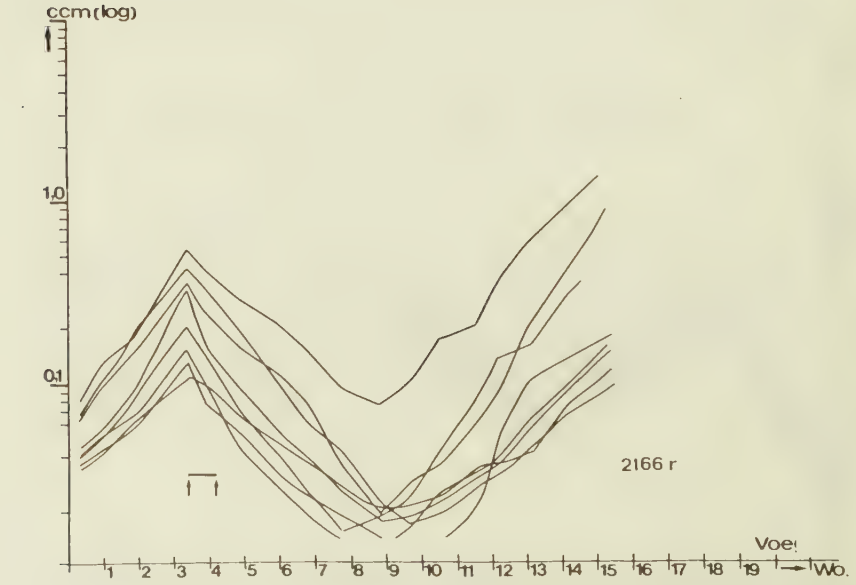


Abb. 20 (3 x 722 rad VOE, nicht normierte Einzelkurven)

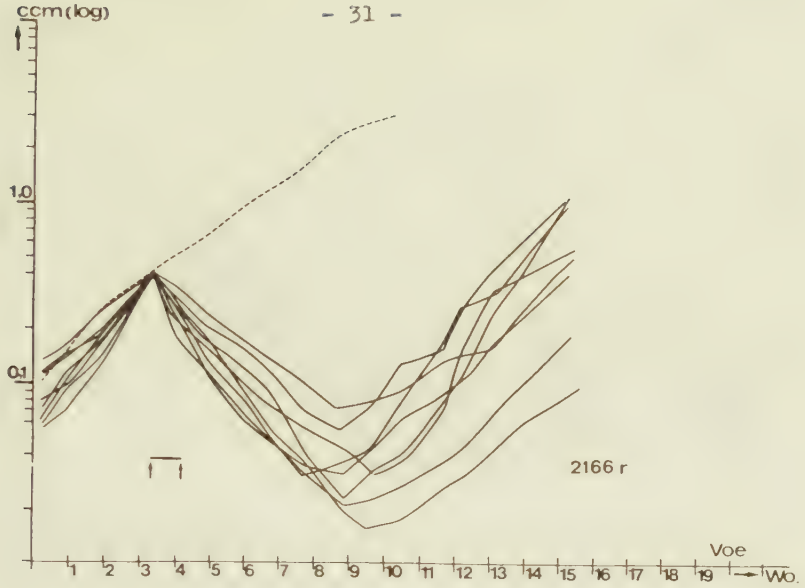


Abb. 21 (3 x 722 rad VOE, normierte Einzelkurven)

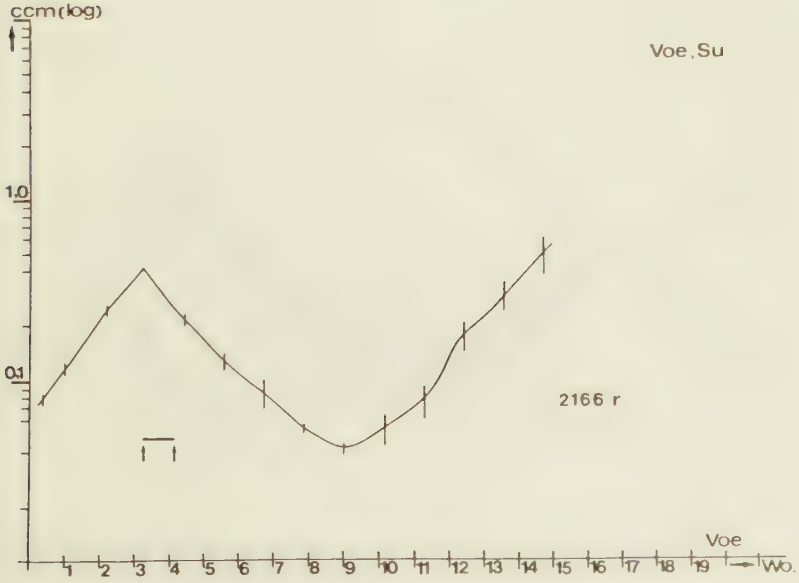


Abb. 22 (3 x 722 rad VOE, Summenkurve)

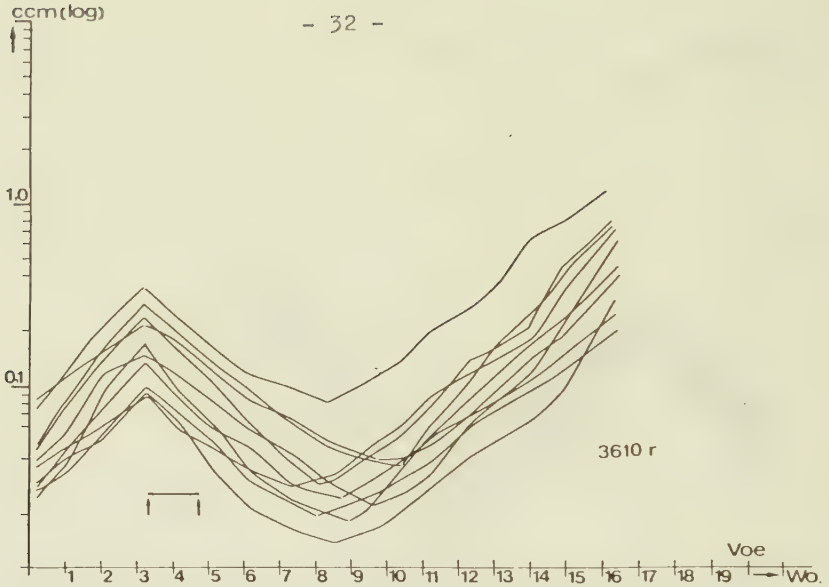


Abb. 23 (5 x 722 rad VOE, nicht normierte Einzelkurven)

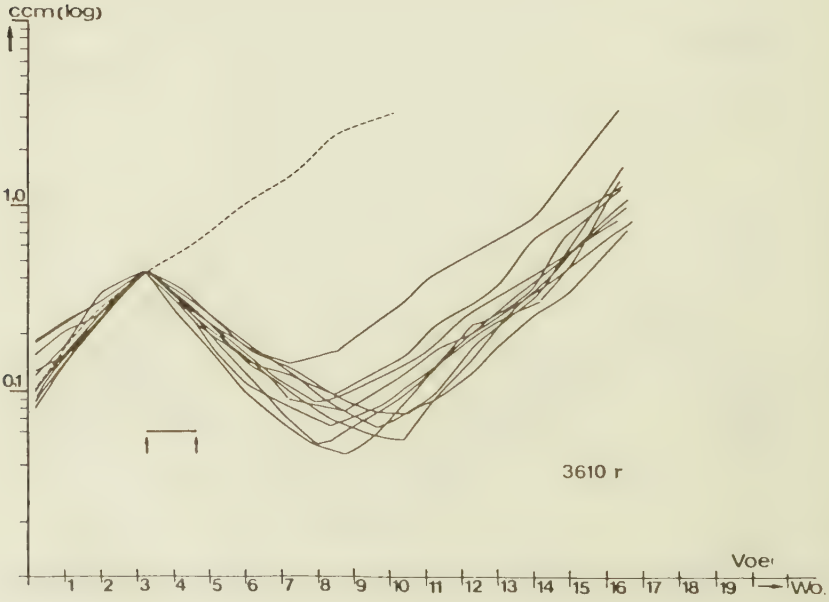


Abb. 24 (5 x 722 rad VOE, normierte Einzelkurven)

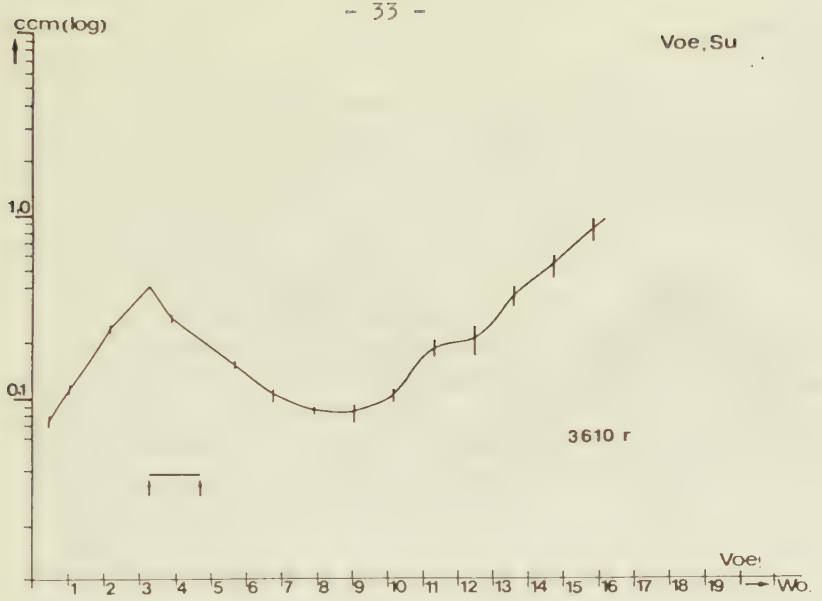


Abb. 25 (5 x 722 rad VOE, Summenkurve)

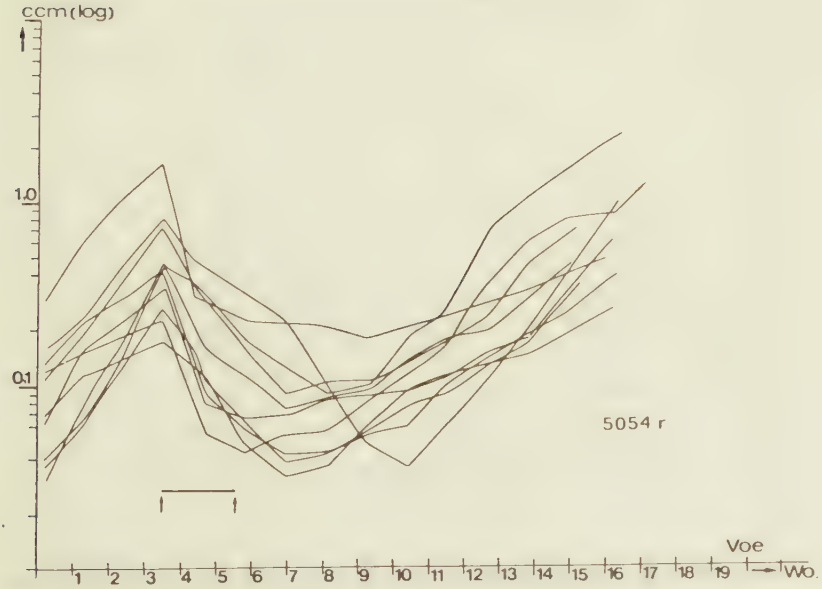


Abb. 26 (5 x 722 rad VOE, nicht normierte Einzelkurven)

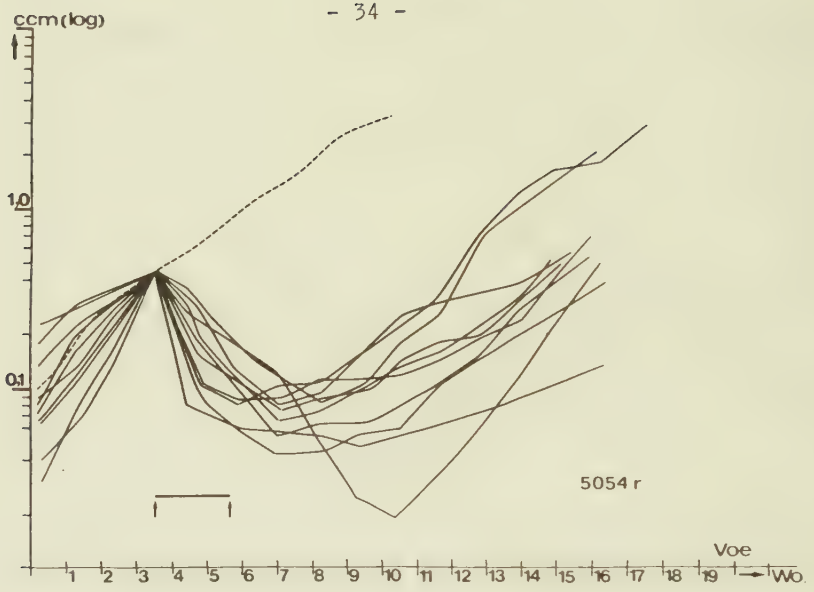
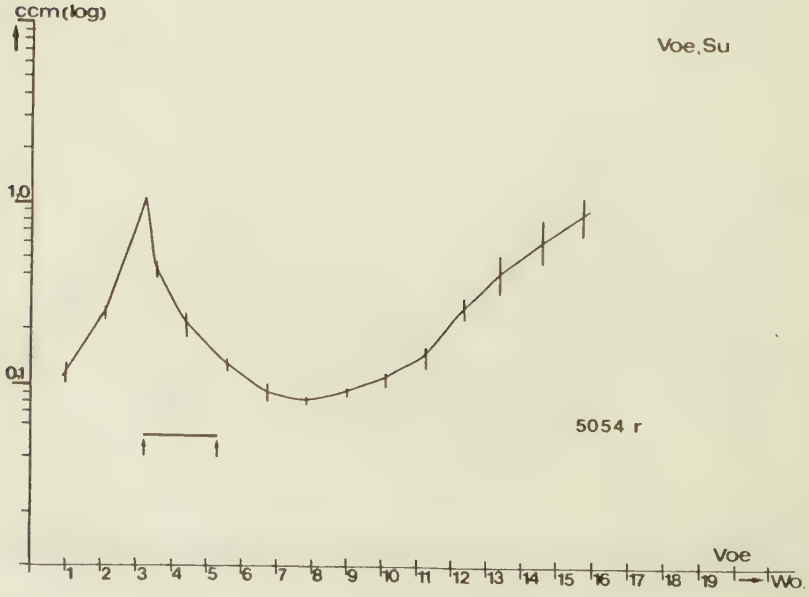


Abb. 27 (7 x 722 rad VOE, normierte Einzelkurven)



Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktion auf die Bestrahlung zum Tumor JA. Aus der Summenkurve für 2 x 722 rad ist ein RGD von 63,7 Tagen ablesbar. Die Werte der Wachstumsverzögerung für die restlichen Gruppen betragen
bei 3 x 722 rad = 76,6 $\pm$ 3,7 Tage
bei 5 x 722 rad = 76,1 $\pm$ 2,5 Tage
bei 7 x 722 rad = 76,3 $\pm$ 3,8 Tage.
Dieser schwächere Bestrahlungseffekt weist auf eine im Gegensatz zum Tumor JA ausgeprägtere Resistenz des Tumors VOE hin. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten wird aus der unten abgebildeten Dosiseffektkurve offensichtlich, bei welcher der RGD (geometrisch gemittelt) die Ordinate in Tagen bildet, die Abszisse die Bestrahlungsdosis in rad angibt.

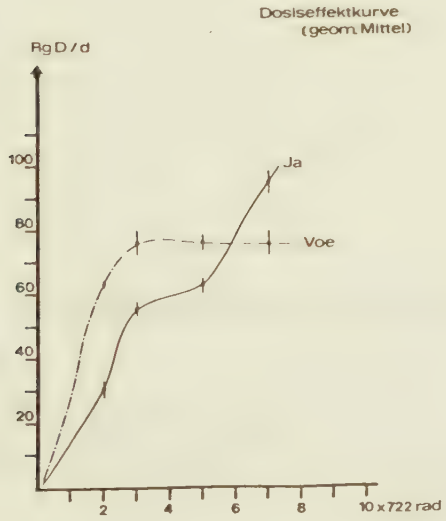


Abb. 29 (Dosiseffektkurve)

Hierbei zeigt die Dosiseffektkurve für den Tumor JA einen schulterförmigen Verlauf. Das heißt, für alle Dosisgruppen läßt sich grundsätzlich ein gesteigerter Effekt nachweisen. Im mittleren Dosisbereich bietet der Tumor die Ausprägung einer steilen Schulter. Im vergleich dazu ist der Tumor VOE in niedrigen und mittleren Dosisbereichen (2 x, 3 x und 5 x 722 rad) durchgehend empfindlicher als der Tumor JA, zeigt aber von 3 x 722 rad an so gut wie keine weitere Effektsteigerung, sondern bildet eine flache, nahezu horzontale Schulter aus, die auch bei 7 x 722 rad keine Steigung erkennen läßt. Eine sigmaförmige Ausbildung der Dosiseffektkurve VOE durch eine Effektsteigerung bei noch größerer Strahlendosis ist in diesem Modell nicht darstellbar, weil dazu Strahlendosen von etwa 7000 - 8000 rad notwendig wären. Solch hohe Strahlendosen sind in sunerem experimentellen Ansatz letal und somit nicht praktikabel.

2) Wachstumskurven im Cytostatika-Zusatzversuch

Das Wachstumsverhalten unserer Tumoren in der Kombination von Bestrahlung und Cytostatikaanwendung zeigen die folgenden sechs Abbildungen.
(Siehe Abbildungen 30 - 35)

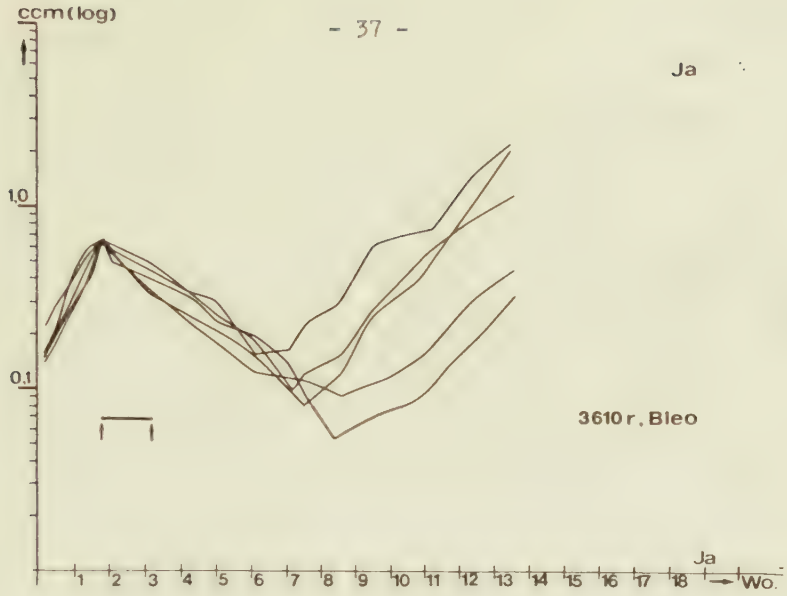


Abb. 30 (5 x 722 rad + Bleomycin JA, normierte Einzelkurven)

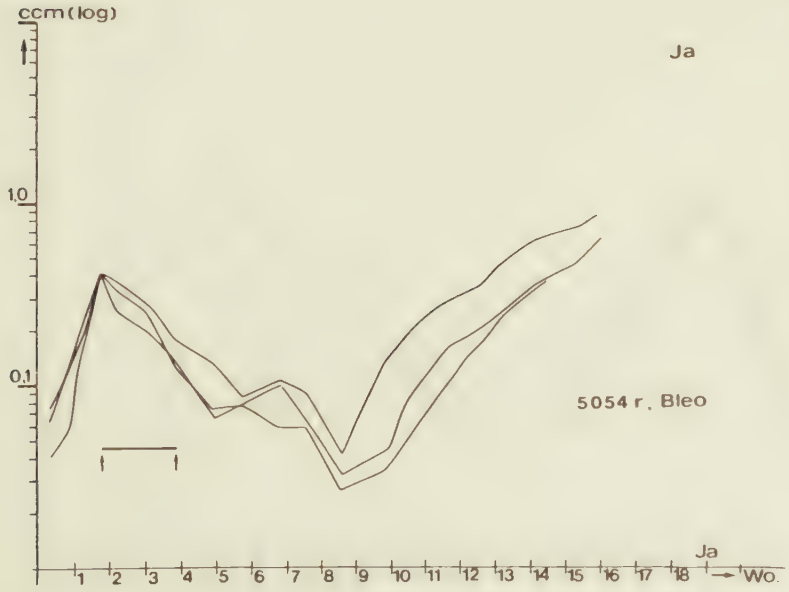


Abb. 31 (7 x 722 rad + Bleomycin JA, normierte Einzelkurven)

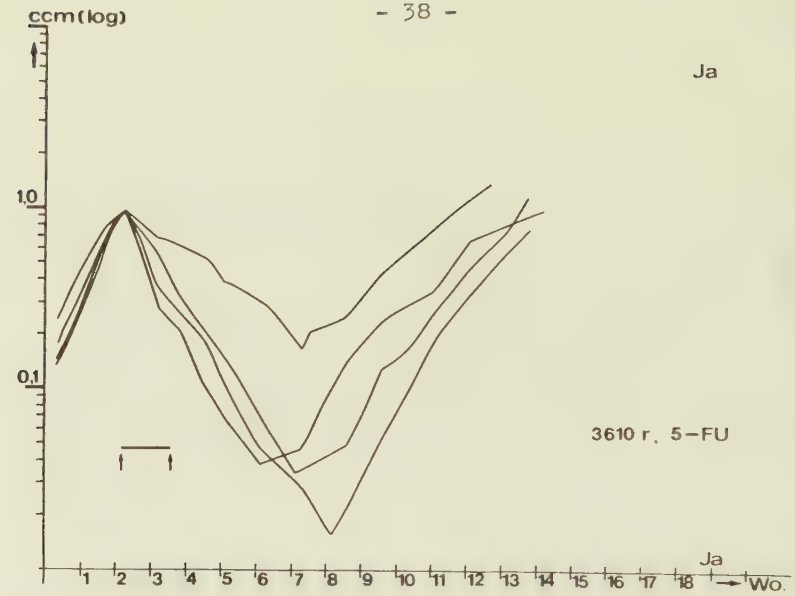


Abb. 32 (5 x 722 rad + 5-FU JA, normierte Einzelkurven)

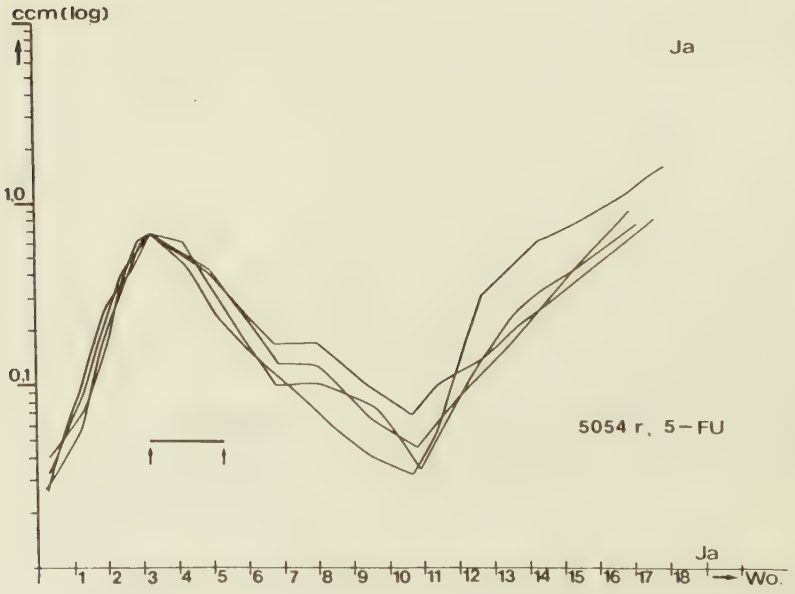


Abb. 33 (7 x 722 rad + 5-FU JA, normierte Einzelkurven)

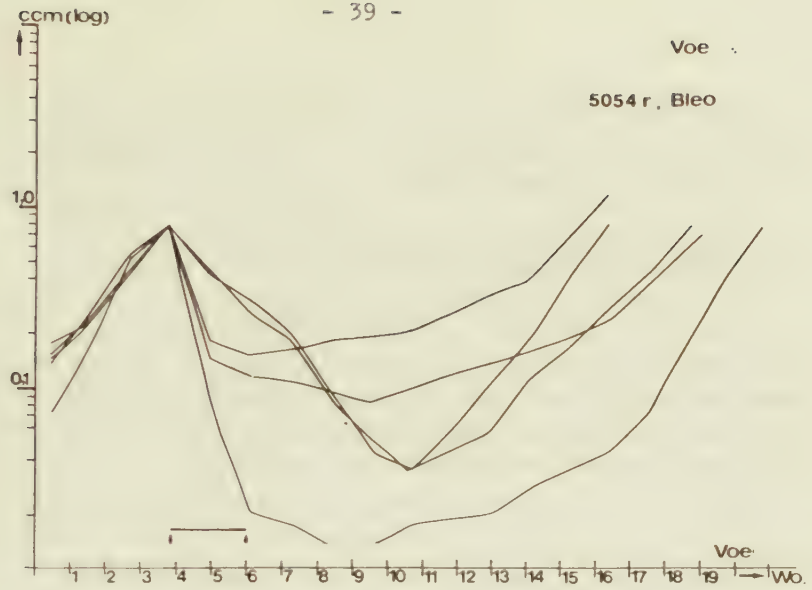


Abb. 34 (7 x 722 rad + Bleomycin VOE, normierte Einzelkurven)

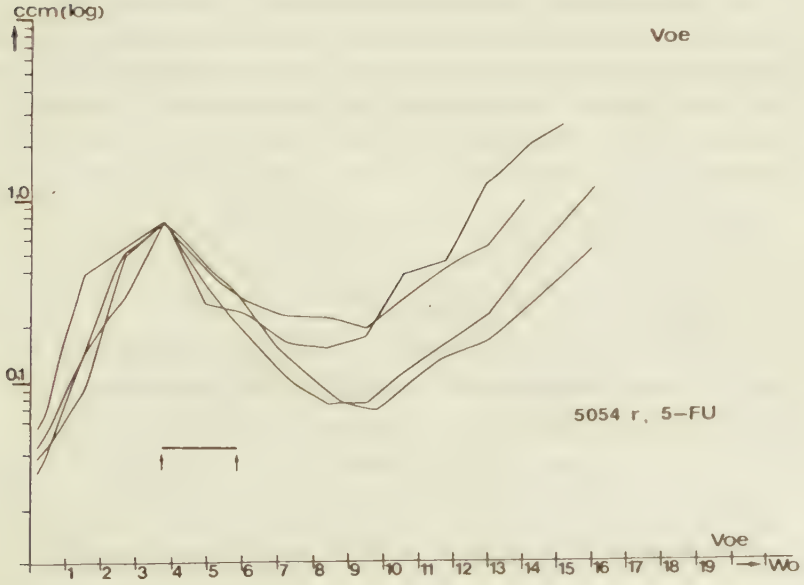


Abb. 35 (7 x 722 rad + 5-FU VOE, normierte Einzelkurven)

Auf Grund der geringen Anzahl von Kurven konnten die RGD-Werte arithmetisch ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigt untenstehende Zusammenfassung:

RGD-Werte im kombinierten Therapieversuch

		Einzelwerte	$\overline{RGD}$
Tu: JA	7 x 722 rad, Bleo	79, 93, 93	/ 88,3
Tu: JA	5 x 722 rad, Bleo	58, 69, 69, 88, 91	/ 75,2
Tu: JA	7 x 722 rad, 5-FU	79, 90, 94, 95	/ 89,5
Tu: JA	5 x 722 rad, 5-FU	66, 79, 82, 83	/ 77,5
Tu: VOE	7 x 722 rad, Bleo	82, 88, 104, 108, 118	/ 100
Tu: VOE	7 x 722 rad, 5-FU	61, 69, 80, 91	/ 75,25

Da nur eine geringe Tierzahl die kombinierte Therapie über einen längeren Zeitraum hinweg überlebte, ist eine statistisch gesicherte Aussage nur bedingt möglich, doch lassen im Ansatz die ermittelten Wachstumsverzögerungen den Schluß zu, daß bei der zusätzlichen Verabreichung von Cytostatika vor einer Bestrahlung keine wesentliche Effektsteigerung zur Strahlenwirkung allein resultiert.

3) Ergebnisse der Autoradiographie

Bei der Auswertung der Autoradiographien fanden sich bei unseren Xenotransplantaten folgende Markierungsindices (LI = Labelling-Index):

Tu: JA = 17 %
Tu: VOE = 13 %

VI. Diskussion

1) Zu den Wachstumskurven:

Der für die Beurteilung einer Strahlenwirkung auf Tumorgewebe herangezogene Parameter der Wachstumsverzögerung (= Regrowth-delay) geht ursprünglich auf eine Arbeit von THOMLINSON und CRADDOCK zurück. Nach der von ihnen erstellten Definition hat man, wie schon oben erwähnt, darunter die Zeitspanne zu verstehen, die ein Tumor braucht, um nach seiner Bestrahlung wieder die Ausgangsgröße oder ein Vielfaches davon zu erreichen. Dieser Vorgang des Rezidivwachstums eines Tumors nach subkurativer Bestrahlung hängt von zahlreichen Faktoren wie Zeitdauer, Fraktionierung, Dosisleistung, Sauerstoffversorgung und Umgebungsgewebe (Tumorbett) ab, ist aber durch seine ebenfalls durch THOMLINSON und CRADDOCK bewiesene Dosisabhängigkeit inzwischen als der aussagekräftigste strahlenbiologische Meßparameter eines in-situ-Modells anerkannt.
Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse zeigte sich, daß der rein zeitliche Begriff des RGD sich hier - morphologisch betrachtet - aus drei ineinandergehenden, jedoch im Bild der W a c h s t u m s k u r v e deutlich unterscheidbaren Phasen zusammensetzt:

a) Das verzögerte Wachstum des Tumors während und bis kurz nach Bestrahlung, wobei dieses Phänomen nur in niedrigen Dosisbereichen (2 x 722 rad) sichtbar wurde.

b) Die Regressionsphase des Tumors.

c) Die Phase der "verzögerten Regression".

d) Die Wiederanstiegsphase, weiter oben als Rezidivwachstum in loco bezeichnet.

Unsere Xenotransplantate zeigten ein dosisabhängiges Wachstumsverhalten, welches wir eigentlich nur von

Einzeitbestrahlungen her kennen (DENEKAMP, 1974). Diese Dosisabhängigkeit war allerdings bei unseren beiden Tumoren unterschiedlich stark ausgeprägt. Weitaus deutlicher bot sie sich beim Tumor JA. Dieser zeigt in allen vier Fraktionierungsgruppen eine mehr oder weniger gleich schnelle Abnahme der Tumorgröße, die einen fast parallelen Abfall der Wachstumskurven zur Folge hat. Dies beweist gleichzeitig, daß die Gesamtbestrahlungsdosis keinen direkten Einfluß auf die Rückbildungsphase hat, was bei der von uns angewandten fraktionierten Bestrahlung nicht von vornherein anzunehmen war, fallen doch die letzten 722-rad-Gaben bei der 5054-rad-Gruppe schon gänzlich in den Bereich des Abfalls der Wachstumskurve und führen dort zu keiner Beschleunigung der Tumorverkleinerung.
Bei der Tumorgruppe VOE findet sich die gleiche Parallelität der Tumorverkleinerung in der Regressionsphase unter den verschiedenen Bestrahlungsregimen. Der unterschiedliche Effekt der Bestrahlungsdosis zeigt sich einzig in der längeren Dauer des initialen steilen Teiles der Regressionsphase. Hierbei wird speziell in der Gruppe JA eine Dosisabhängigkeit deutlich. So tritt z. B. der mit 1444 rad bestrahlte Tumor schon nach etwa 8 Tagen in seine "verzögerte Regressionsphase", während der mit 5054 rad bestrahlte Tumor sich erst nach 53 Tagen nicht mehr weiter verkleinert.
Innerhalb des parallelen Größenabfalls nach Bestrahlung bietet sowohl der Tumor JA als auch der Tumor VOE in einem Zeitraum von 10 Tagen und bei Bestrahlung mit 3 x 722 rad eine Schrumpfung auf ca. 50 % des Ausgangsvolumens.
In niedrigen Dosisbereichen beobachteten wir bei unseren Tumoren, daß diese nach Bestrahlungsende noch durchschnittlich 3 Tage lang verlangsamt weiterwuchsen, bevor sie in die Regressionsphase eintraten. Diese Erscheinung konnte lediglich in seinem Gesamtdosisbereich bis 1444 rad nachgewiesen werden, während alle anderen höheren Strahlen-

Applikationen kein Weiterwachstum nach Bestrahlungsbeginn zur Folge hatten. Dieses kurzfristige Wachstum steht im Einklang mit Versuchsergebnissen von BARENSEN und HERMENS (1967), die bei Bestrahlung ihrer Tumoren mit allerdings 1000 rad als Einzeitbestrahlung bei einem Rhabdomyosarkom der Ratte ebenfalls eine Gesamtproliferationstendenz nach Bestrahlung für etwa 4 Tage feststellten. Sie führten dies darauf zurück, daß die letale Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Tumorzellen erst nach mehreren Tagen zum Tragen kommt und in dieser noch verbleibenden Zeitspanne die proliferationsfähigen Zellen (0,08 %) noch in der Lage sind, Mitosen durchzuführen.

Das Wachstumsverhalten in den Phasen der postradialen Proliferation und der Regression wird im wesentlichen bestimmt durch das Verhältnis der Zellproduktion durch überlebende, noch teilungsfähige Zellen zur Eliminationsrate der abgetöteten Tumorzellen. Eine Verkürzung der Zellzykluszeiten innerhalb der proliferierenden Tumorzellfraktion und damit eine Vergrößerung des Tumors ist lt. BARENSEN nur dann möglich, wenn diese Fraktion bei nicht bestrahlten Tumoren noch eine, durch Optimierung der Umgebungseinflüsse (z. B. Sauerstoff) aktivierbare Proliferationsreserve besitzt. Daraus schloß er, daß die Elimination der strahlengeschädigten Zellen für die überlebende Zellfraktion einer Verbesserung ihrer Lebensbedingungen gleichkommt. Dieser bei Einzeitbestrahlung sichtbare Effekt ist bei den mit mehr als zwei Fraktionen bestrahlten Tumoren, wie dies bei jeweils 3 von unseren Tumorgruppen der Fall war (3 x, 5 x und 7 x 722 rad), nicht mehr zu beobachten. Daraus könnte man in Anlehnung an BARENSEN zu dem Schluß kommen, daß die nach der ersten Bestrahlung "herausgefilterte" proliferierende Zellfraktion von der folgenden Dosis umso empfindlicher getroffen wird, da sie in der Zwischenzeit einen höheren Oxygenisationsgrad erreicht hat. Die Fähigkeit

zur Reoxygenierung ist lt. van PUTTEN (1968) jedoch bei den verschiedenen Tumoren völlig unterschiedlich ausgebildet. So fand er bei einem transplantierten Mäuseosteosarkom unter fraktionierter Bestrahlung mit 4 x 250 rad fast keine Reoxygenierung von vorher anoxischen Zellen im Intervall. Er selbst wie auch andere Autoren (M. MAEDA, H. D. SUIT, 1965) hatte zuvor an anderen Experimentaltumoren genau gegensätzliche Ergebnisse erzielt und unter der fraktionierten Bestrahlung einen erheblichen Abfall der überlebenden anoxischen Zellfraktion gemessen.

Der Zeitpunkt, an dem die Wachstumskurve den linear absteigenden Schenkel verläßt, d. h. die lineare Wachstumsverminderung sich abschwächt, stellt den Beginn der von uns so bezeichneten "verzögerten Regressionsphase" dar. Diese ist dann abgeschlossen, wenn die Wachstumskurve ihren endgültigen Wiederanstieg beginnt und damit zur Darstellung des Rezidivwachstums wird. Die Abhängigkeit der Dauer der "verzögerten Regressionsphase" von der Gesamtdosis der applizierten Röntgenstrahlen zeigt sich deutlich in folgender Tabelle:

	2 x 722 rad	3 x 722 rad	5 x 722 rad	7 x 722 rad
VOE	8 d	8 d	16 d	24 d
JA	8 d	14 d	16 d	32 d

Auffällig ist die extreme Verzögerung des Beginns des Rezidivwachstums bei der Bestrahlung mit 7 x 722 rad, während die Dauer der "verzögerten Regressionsphase" in den

anderen Dosisgruppen eine fast lineare Abhängigkeit erkennen läßt.

Eine zweite Verzögerungsphase innerhalb des Rezidivwachstums, allgemein als "second wave of delay" bezeichnet, fand sich, wenn auch nur geringem Ausmaß auch bei unseren Plattenepithelcarcinomen in allen Dosisbereichen. Sie kommt vermutlich dadurch zustande, daß unter der Bestrahlung neben den Tumorzellen auch Stromagewebe des Tumorbettes in Mitleidenschaft gezogen wird. Reichen bei geringem Wachstumsanstieg die Ernährungsmöglichkeit des Umgebungsgewebes zur Versorgung des wachsenden Tumors aus, so wird ab einer bestimmten Tumorgröße das Stroma zum wachstumslimitierenden Faktor. Hat sich auch das Umgebungsgewebe von der Strahlenschädigung erholt, so wächst das Rezidiv mit der vorher eingehaltenen Wachstumsgeschwindigkeit weiter. Im Gegensatz zu THOMLINSON und CRADDOCK die den "second wave of delay" bei ihren Tumoren erst dann fanden, wenn diese ihre Vorbestrahlungsgröße überschritten hatten und so den "second wave of delay" erst jenseits des RGD definierten, fanden wir eine Verzögerung der Wachstumsgeschwindigkeit (ohne Volumenverlust!) noch bevor die Tumoren ihre Ausgangsgröße wiedererreicht hatten. Somit wollen wir die Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit im Rezidiv unserer Tumoren nur als T u m o r b e t t e f f e k t bezeichnen. Dadurch wird der Schluß von THOMLINSON und CRADDOCK, die Strahlenschädigung des Stromas würde das Rezidiv erst limitieren, wenn dieses seine Ausgangsgröße überschritten hat, zweifelhaft. Es ist auch nicht unbedingt einzusehen, warum ein strahlengeschädigtes Stroma nicht schon vor dem Erreichen der Vorbestrahlungsgröße das Tumorwachstum behindern sollte. Bei der Annahme, daß die Tumorzellen rascher wachsen als das umgebende Gewebe, ist, da beide ja zum gleichen Zeitpunkt geschädigt werden, die Einwirkung des Stromaschadens auf das Rezidivwachstum eigentlich viel früher zu erwarten. Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen bei THOMLINSON und CRADDOCK

so spät gefundenen "second wave of delay" besteht darin, daß - wie ja durch den Versuchsaufbau angestrebt - die Tumorzellen wesentlich intensiver geschädigt wurden als das umgebende Gewebe. Folgende Abbildung zeigt die Lage des "second wave of delay" in den Wachstumskurven beim THOMLINSON und CRADDOCK.

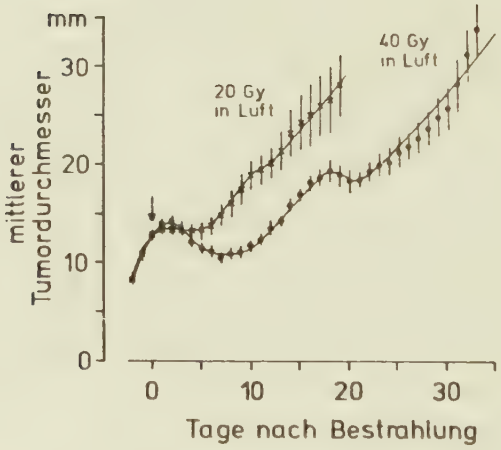


Abb. 36:
Gemittelte Wachstumskurven des Fibrosarkoms RIB 5 der Ratte nach Einzeitbestrahlung in Luft (nach THOMLINSON und CRADDOCK, 1967)

Die letzte Phase der Wachstumskurve bis zur Limitierung durch Nekrose und Tumorverfall kann als manifestes Rezidiv bezeichnet werden. Eine große Schwankungsbreite in den Wachstumsgeschwindigkeiten ihrer Rezidive ließen THOMLINSON und CRADDOCK zu dem Schluß kommen, daß diese nicht mehr von

der gegebenen Strahlenschädigung abhängig seien und sich somit wie - zwar langsamer proliferierende - aber noch nicht bestrahlte Tumoren verhielten. Diese Eigenständigkeit des Rezidivwachstums konnten wir bei unseren Plattenepithelcarcinomen JA und VOE nicht nachvollziehen. Auch in den Tumorvolumenverdoppelungszeiten n a c h Erholung vom Tumorbetteffekt spiegelt sich die Strahlenwirkung dosisabhängig wider. Wir fanden folgende Werte:

Tumorvolumenverdoppelungszeiten nach dem "second wave of delay"

Tu: JA	2 x 722 rad =	9 Tage
	3 x 722 rad =	14 Tage
	5 x 722 rad =	12 Tage
	7 x 722 rad =	16 Tage
Tu: VOE	2 x 722 rad =	10 Tage
	3 x 722 rad =	11 Tage
	5 x 722 rad =	13 Tage
	7 x 722 rad =	17 Tage

Diese Werte sind ein Anhalt für das Weiterwirken des T u m o r b e t t e f f e k t e s .

2) Zur Dosiseffektkurve:

Die Metnode, die biologische Strahlenwirkung auf lebende, d. h. sich reproduzierende Zellen im Experiment nachzuvollziehen, führte 1955 (PUCK und MARCUS) zur erstmaligen Erstellung von sogenannten Dosiseffektkurven. Da zu dieser Zeit in-vivo-Verfahren noch nicht ausreichend standarisiert

waren, mußte man sich als Parameter für die Strahlenwirkung der Anzahl überlebender Zellen aus HeLa-Zellkulturen bedienen. 1967 stellte BARENSEN ähnliche Kurven an Hand von Arbeiten mit menschlichen Nierenzellkulturen auf. Diese in solchen in-vitro-Verfahren ermittelten Dosiseffektkurven zeichneten sich unabhängig von der Herkunft der ihnen zugrundeliegenden Zellkulturen durch eine mehr oder minder gleiche Form aus: in linearer Darstellung ergaben sich sigmoide-, in halblogarithmischer Darstellung sogenannte Schulterkurven.
THOMLINSON und CRADDOCK stellten derartige Dosis-Wirkungsbeziehungen, auch gestützt auf in-vivo-Experimente mit Fibrosarkomen der Ratte, erstmals vor ca. 10 Jahren auf. Als Parameter für die biologische Strahlenwirkung mußte beim Arbeiten mit solchen soliden Tumoren die Wachstumsverzögerung dienen. Sie erhielten bei Einzeitbestrahlung in Luft eine biphasische Kurve, deren erster Teil relativ steil, der zweite dagegen erheblich flacher verlief. Weitere, mit den gleichen Tumoren unter anoxischen Bedingungen erstellte regrowth-delay-Werte ergaben eine Dosiseffektkurve, die von Beginn an einen exponentiellen Anstieg zeigte, in ihrer Steigung allerdings dem zweiten, d. h. flacheren Teil der Kurve von unter Luft bestrahlten Tumoren entsprach. Daraus schlossen sie, daß für den oben beschriebenen flachen Teil der Kurve von unter oxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren eine anoxische Fraktion von Zellen im Tumor verantwortlich sein müßte, auf die sich die weitere Proliferation des Tumors gründet, und die allerdings - wie man an der benötigten hohen Strahlenintensität ablesen konnte - besonders resistent sein mußte. Auf Grund dieser Feststellungen und der Tatsache, daß der steile Anfangsteil der Dosiseffektkurve durch die Empfindlichkeit der besonders gut oxygenierten Zellen verursacht wird, schlossen THOMLINSON und CRADDOCK, daß jeder solide Tumor, der in der Darstellung seiner Strahlenreaktion eine biphasische Dosis-Wirkungsbeziehung aufweist, aus zwei

Subpopulationen, einer oxischen sowie einer anoxischen besteht. Ohne den Einfluß der Sauerstoffsättigung auf das Proliferationsverhalten von Zellen unter Bestrahlung gekannt zu haben, wiesen schon KELLERER und HUG (1963) bei ihren Arbeiten mit Zellkulturen darauf hin, daß Anfangs- und Endteile der von ihnen ermittelten Dosiseffektkurven durch die jeweils empfindlichsten bzw. resistentesten Zellen ihrer Kultur abhängig waren und diese Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl eine Minderheit darstellten, die auf Grund ihrer weiten statistischen Streuung zu großen Schwierigkeiten in der Darstellung führten.
Auch unsere Dosiseffektkurven zeigten entsprechend den oben beschriebenen Ergebnissen einen sigmaförmigen Verlauf, wobei zu betonen ist, daß es sich bei unseren Untersuchungen nicht um Einzeit-, sondern um Fraktionierungsbestrahlungen handelt.

Neben THOMLINSON und CRADDOCK hatte schon Mc. NALLY 1973 darauf hingewiesen, daß bei Extrapolation des anoxischen = flachen Verlaufsteils einer Dosiseffektkurve auf die Ordinate die Größe der anoxischen Fraktion ermittelt werden kann. Dies ist allerdings nur zulässig, wenn man als Ordinatenmaßstab, wie bei in-vitro-Versuchen, die Zellzahl oder das Tumorvolumen wählt. Da die Ordinate in unseren Dosiseffektkurven den RGD, also eine zeitliche Größe darstellt, ist eine numerische Festlegung der anoxischen Fraktion natürlich nicht möglich.

Um eine Dosiseffektkurve zu erstellen, muß man die in den verschiedenen Bestrahlungsgruppen erhaltenen Einzelwerte der Wachstumsverzögerung mitteln. Zur Verfügung stehen uns das arithmetische, geometrische und harmonische Mittel sowie der Median.
SCHLECHTWEG fand in seiner Arbeit über das H.P.-Melanom 1978, daß die regrowth-delay-Werte in den einzelnen Gruppen

eine logarithmische Normalverteilung zeigten und bewies diese Tatsache, indem er die Werte der Wachstumsverzögerung als kumulative Häufigkeit aufführte und in dieser graphischen Darstellung bei fast allen seinen Tumorgruppen annähernd eine Gerade erhielt. Aus diesem Befund eine Regel ableiten zu wollen ist allerdings nicht für alle in-situ-Modelle schlüssig, da RGD-Werte von unabhängigen Individualtumoren einer Tumorspezies nicht alle logarithmisch normalverteilt sein müssen. Eine vergleichende Aufstellung der auf verschiedene Weise gemittelten RGD-Werte ergibt, daß diese bei unseren Versuchen sehr dicht beieinander liegen.

	Arithmet. Mittel	Geometr. Mittel	Harmon. Mittel	Median	
Tu: VOE					
2 x 722 rad	63	63,74	63	64	Tage
3 x 722 rad	77	76,6	76	74	Tage
5 x 722 rad	77	76,1	76	79	Tage
7 x 722 rad	77,25	76,28	75,4	80	Tage
Tu: JA					
2 x 722 rad	31,5	30,8	30,2	32	Tage
3 x 722 rad	56,4	56,1	55,8	58	Tage
5 x 722 rad	65,3	64,5	63,6	66	Tage
7 x 722 rad	96	95,3	94,6	99,5	Tage

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß für alle vier Dosisbereiche der Median jeweils größer ist als das arithmetische Mittel. Dieses spricht für eine linksschiefe Verteilung der Einzelwerte. Einer logarithmischen Normalverteilung liegt

aber in der Regel eine rechtsschiefe Verteilungskurve zugrunde. Rein rechnerisch ermittelten wir, daß unsere RGD-Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % nicht logarithmisch normalverteilt wären. Wenn, wie unsere Tabelle ebenfalls zeigt, der Median und das arithmetische Mittel dicht beieinander liegen, spricht dies sogar am ehesten für eine symmetrische Verteilung. In einer solchen käme der Median dem "wahren Mittel" am nächsten. Daraus läßt sich folgern, daß auf Grund der symmetrischen Streuung unserer Meßwerte eine Erhöhung der Tierzahl pro Versuchsgruppe keine bedeutsame Steigerung der Genauigkeit der Aussage zur Folge gehabt hätte und somit auch unsere Versuchsgruppen mit niedrigeren Tierzahlen statistische Schlüsse erlauben.
Eine Darstellung der Dosiseffektkurve auf Grund der Median-RGD-Werte zeigt Abb. 37. Diese läßt im Vergleich zu Abb. 29 für den Tumor VOE im Bereich von 7 x 722 rad doch noch eine - wenn auch geringe - Effektsteigerung erkennen.

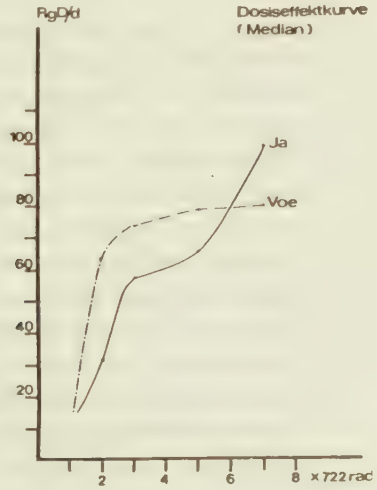


Abb. 37:
Dosiseffektkurve
aus den Medianwerten
der Wachstumsverzögerung

3) Zur Kombinationstherapie

a) Versuche mit 5-Fluor-Uracil

VIETTI und EGGERDING erprobten schon 1971 den synergistischen Effekt von 5-FU-Gaben kombiniert mit der Bestrahlungstherapie. Es wurden dabei Vergleiche angestellt zwischen Bestrahlung von Tumoren allein, alleiniger 5-FU-Gabe sowie der kombinierten Behandlung. Die Abstände der Cytostatikagaben vor bzw. nach Bestrahlung sowie deren Dosierungen wurden bei den einzelnen Versuchen sehr unterschiedlich gehandhabt. So schwankten die 5-FU-Applikationen zwischen 10 und 20 Stunden vor Bestrahlungsbeginn und auch die Dosierungen von 5-FU wurden, z. B. bei LOONEY bis zu 150 mg / kg / KG der Versuchstiere erhöht, was bei einer Anwendung am Menschen völlig ausgeschlossen wäre.

Bei den Untersuchungen von Zellreaktionen auf die Verabfolgung von 5-FU allein gestaltete sich der Nachweis des Effektes auf die Mitoserate etwas schwierig, da sich das Postulat von DENEKAMP (1972), die strahleninduzierte Mitoseverzögerung und die daraus folgende Volumenabnahme sei eine Funktion des Zellverlustes, bei Anwendung von 5-FU nicht eindeutig bestätigte. Denn während die Mitoserate bei Verabfolgung von 5-FU, nachdem sie direkt nach Bestrahlung einen Abfall um 80 % zeigte, wieder zur Norm zurückkehrte, folgte ihr jetzt kein rapider Anstieg mehr, der üblicherweise mit einem mit der Mitoseverzögerung kombinierten Zellverlust vergesellschaftet ist. Daraus ließ sich der Schluß ziehen, daß sogar während der Periode der Mitoseverzögerung der Zellverlust sich nicht wesentlich steigert. So zeigte auch KOVACS in einem Versuch, bei dem Tumoren mit 150 mg / kg / KG behandelt wurden, daß zwar nach 48 Stunden eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums erkennbar war, dafür aber beim Wiederbeginn der Wachstumstätigkeit keine signifikante Erhöhung der

durchschnittlichen Tumorvolumenverdoppelungszeit (TVD) gegenüber unbehandelten Tumoren, sondern eher eine Verkürzung, eintrat.
Bei unseren mit 5-FU behandelten Tumoren, die ausschließlich mit Dosismengen von 7 x 722 rad und 5 x 722 rad bestrahlt wurden, fanden wir sowohl beim Tumor JA als auch beim Tumor VOE keine Veränderung der Reaktion auf die Strahlenbehandlung.

		TVD
VOE	7 x 722 rad / 5-FU	13 Tage
JA	7 x 722 rad / 5-FU	15 Tage
JA	5 x 722 rad / 5-FU	11 Tage
VOE	7 x 722 rad reine Bestrahlung	16 Tage
JA	7 x 722 rad reine Bestrahlung	18 Tage
JA	5 x 722 rad reine Bestrahlung	13 Tage

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse muß in Übereinstimmung der Arbeiten von KOVACS festgestellt werden, daß auch hier bei Eintritt der Tumoren in die erneute Wachstumsphase keine Steigerung der Tumorvolumenverdoppelungszeit zu verzeichnen ist. Dagegen hätte man erwarten können, daß sich ein synergistischer Effekt in Bezug auf ein verlängertes Intervall bei der Verkleinerung der Tumoren einstellte. Doch auch der Vergleich dieser Phasen ergibt keinen Unterschied zwischen mit und ohne Cytostatikagaben bestrahlten Tumoren. Unsere Ergebnisse, die in diesem Punkt mit denen anderer Untersucher nicht übereinstimmen, liegen evtl. im unterschiedlichen Versuchsaufbau begründet. Wie schon oben erwähnt, wurden die Versuchstiere meist mit e i n m a l i g e n Dosen zwischen 50 und 250 mg / kg / KG 5-FU behandelt, wobei wir mit

25 mg / kg / KG weit unter dem sonst im Bierversuch üblichen Dosisbereich lagen. Da wir jedoch unsere Versuchsanordnung so weitgehend wie möglich derjenigen in der klinischen Praxis angleichen wollten, erhöhten wir die Cytostatikagaben nicht weiter. Hinzu kommt, daß es sich bei den Versuchstieren in den bisher vorliegenden Arbeiten meist um Ratten handelt, wir jedoch mit den weitaus empfindlicheren Nacktmäusen arbeiteten und uns in unserer 5-FU-Dosierung schon im Grenzbereich zur Letaldosis befanden, was sich in einer deutlich höheren Absterberate der Tiere dieser Gruppe im Vergleich zu den Tieren der nur bestrahlten Gruppen ausdrückt.

b) Versuche mit Bleomycin

Wir benutzten Bleomycin zur Effektsteigerung der Bestrahlung, da es nach vorübergehender Teilsynchronisation des Tumorgewebes zu einer überwiegend irreversiblen Blockade des Zellzyklus in der späten S- und in der G_2-Phase führt. Kombinierte Bleomycin-Strahlentherapien wurden gerade bei Behandlung von Plattenepithelcarcinomen bevorzugt verwende (so beschrieben bei SCHUMANN, CONSTANZI et al.).
Nach GANZER beruht jedoch der verbesserte Bestrahlungseffekt nach vorausgegangener Bleomycin-Behandlung nicht auf einer Teilsynchronisation, sondern auf einer zusätzlichen Zerstörung mitosefähiger Zellen in der G_2-Phase, insgesamt also nur auf einer Addition schädigender Effekte Er zeigte in cytophotometrischen und autoradiographischen Versuchen mit 5 Carcinomen des Kopf-und-Hals-Bereiches (darunter 2 verhornende Plattenepithelcarcinome des Mundbodens, 1 papilläres Gehörgangscarcinom), die er vor Entnahme der Proben mit Bleomycinperfusionen und -injektione bei einer Gesamtdosis bis 300 mg behandelte, daß offenbar eine Teilsynchronisation, bei der die reversible Blockade in der S-Phase liegt, nur bei Verabfolgung einer Einzeldosis stattfindet. Bei weiterer kontinuierlicher Therapie

mit Bleomycin ist sie dann nicht mehr nachweisbar.
Die Behauptung, die Senkung der Mitoserate in bleomycinbehandelten Tumoren sei auch auf einen unmittelbaren Verlust an Zellen zurückzuführen, begründete er damit, daß Zellen, die vom Cytostatikum so geschädigt wurden, daß sie nach einer Teilreparation der DNA zwar den Eintritt in die Mitosephase vollziehen können, jedoch zur ungestörten Reproduktion unfähig sind, dann als Endomitosen aus dem Zyklus ausscheiden (siehe auch HITTELMAN und RAO).
Vergleichende histologische Untersuchungen zwischen bleomycinbehandelten und unbehandelten Plattenepithelcarcinomen zeigen auffällige Veränderungen der Morphologie im Sinne einer Fibrosierung des Gewebes und des Auftretens hyperkeratotischer Zellen mit anomalen Kernen (DESAI et al.).
Diese histologischen Veränderungen lassen sich - wie oben beschrieben - zellkinetisch so erklären, daß die Teilschädigung der Zellen in der S-Phase und der Mitose zur Polyploidie führt.

Wie schon im Kapitel "Material und Methode" beschrieben, verabfolgten wir vor jeder Bestrahlung den Versuchstieren jeweils 3 Injektionen intraperitoneal mit einer Gesamtdosis von 0,06 µg Bleomycin, was einer Menge von etwa 49 mg / kg / KG der Maus entspricht.
Bei der Betrachtung der Tumorwachstumskurven nach Bestrahlungsende konnten wir allerdings im Vergleich zu den Tiergruppen, welche ohne vorherige Cytostatikagabe mit der gleichen fraktionierten Gesamtdosis bestrahlt wurden, keine signifikante Veränderung der Kurvenverläufe - soweit das bei der geringen Anzahl der überlebenden Tiere aussagekräftig war - feststellen.

4) Zur Histologie

TANNOCK zeigte 1968 in einer Arbeit mit Mamma-Adenocarcinomen, daß Tumoren schon ab 1 cm Durchmesser deutlich von Nekrosen durchsetzt waren. Hauptsächlich um die axialen versorgenden Blutgefäße liefen Stränge lebenden Tumorgewebes. Diese Gewebsstränge hatten Durchmesser von ca. 60 - 120 µm. Zwischen dem Blutgefäß und dem Nekroseareal konnte TANNOCK drei Zonen von Tumorzellen unterscheiden, welche sich hinsichtlich ihrer Mitose- und Markierungsindices deutlich voneinander absetzten. Es fand sich ein ausgeprägtes Gefälle in Richtung der Nekrosezone, d. h. Markierungs- und Mitoseindices in der äußeren nikrosenahen Zone waren nur noch halb so hoch wie in der inneren blutgefäßnahen. Die Markierungen, die er über einen Zeitraum von 2 Tagen durchführte, ergab dann eine Wanderungsbewegung der Tumorzellen zentrifugal von den Blutgefäßen zur äußeren Zone. Genauere Messungen zeigten, daß der Durchmesser der vitalen zirkulären Tumorstränge ungefähr dem Diffusionsradius des Sauerstoffs in das Tumorgewebe - von der Blutgefäßwand aus betrachtet - entsprach. Dies ließ den Schluß zu, daß der Sauerstoffmangel bzw. -entzug den Hauptfaktor für die Entstehung der Nekroseareale darstellte. Hinzu kam die Rückdiffusion von toxischen Stoffen abgestorbener Tumorzellen. In diesem Punkt stützte sich TANNOCK in der Hauptsache auf die Arbeiten von THOMLINSON und GRAY (1955), welche an Hand der histologischen Struktur menschlicher Lungencarcinome die begrenzte Sauerstoffdiffusion als Determinante für die zonenmäßige Verteilung der Nekroseareale herausstellten. In der Folge zeigten HERMENS und BARENDSEN (1967) an Rhabdomyosarkomen sowie ROCKWELL et al. (1972) ebenfalls an einem Sarkom, daß in den sauerstoffarmen Gebieten die Intermitosezeiten signifikant verlängert waren.

Bei unseren beiden Xenotransplantaten fand sich grobquantitativ ein für beide Tumorspezies gleicher Abfall der Nekroseareale in Richtung auf die versorgenden Blutgefäße. Für beide Tumoren konnte - sowohl im Originaltumor als auch im Xenotransplantat -

ein Nekroseanteil von ca. 10 % ermittelt werden. Dieser Ausgangswert änderte sich unter der fraktionierten Bestrahlung dosisabhängig.
Überschlagsmäßig fanden sich bei beiden Tumoren folgende Nekrosegehalte:

unter Bestrahlung mit	3 x 722 rad	30 %
" "	5 x 722 rad	35 %
" "	7 x 722 rad	45 bis max. 50 %

Eine ausführliche quantitative Auswertung der Nekroseareale erfolgt z. Z. in der Dissertationsarbeit S. KAMPER (Universität Düsseldorf).

VII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte das Verhalten xenotransplantierter menschlicher Tumoren aus dem Kopf- und Halsbereich auf fraktionierte Bestrahlung mit und ohne Cytostatikazusatz untersucht werden. Als Trägertiere dienten uns thymusaplastische nu/nu-Mäuse, die erstmals 1968 als in-situ-Modell beschrieben wurden. Die fraktionierte Bestrahlung wurde an zwei verschiedenen Plattenepithelcarcinomen (VOE u. JA) mit jeweils 1, 2, 3, 5 und 7 Fraktionen zu 722 rad durchgeführt. Als Cytostatika kamen Bleomycin sowie 5-Fluor-Uracil zur Anwendung, wobei die in der klinischen Praxis übliche Dosierung (mg/kg/KG) auf das Mäusemodell übertragen wurde.

Von sämtlichen Tumorgruppen wurden Wachstumskurven erstellt und analysiert. Dabei fanden sich im postradialen Wachstumsverlauf Dosisabhängigkeiten in verschiedenen Phasen der Wachstumskurven. Die von THOMLINSON und CRADDOCK als "second wave of delay" beschriebene Wachstumsverzögerung wurde bei unseren Tumoren im Rezidivwachstum zu einem früheren Zeitpunkt gefunden und als Tumorbetteffekt interpretiert.

Die Messung der Reaktion auf die überwiegend subcurativen Bestrahlungsdosen erfolgte mit der Methode der Wachstumsverzögerung (Regrowth delay assay). Dabei führten die ermittelten RGD (Regrowth delay) -Werte zur Darstellung von Dosiseffektkurven, wobei die unterschiedliche Strahlensensibilität der beiden im Versuch verwendeten Tumoren deutlich wurde. Außerdem zeigte sich, daß die einzelnen RGD-Werte jeder Tumorgruppe nicht - wie früher angenommen grundsätzlich logarithmisch normalverteilt waren, sondern eher einer symmetrischen Verteilung entsprachen.

Bei den Versuchen mit einer Cytostatika-Kombinationstherapie konnten dann in den Parametern RGD und TVD (Tumorvolumenverdoppelungszeit) keine signifikant günstigeren Ergebnisse erzielt werden als unter alleiniger Bestrahlung.
Schließlich ergab die Auswertung der Tumorhistologie eine Abhängigkeit der Ausdehnung der Nekrosezonen von der Bestrahlungsdosis.

Literaturverzeichnis

1) AMLACHER, E.
Autoradiographie in Histologie und Cytologie, 1. Auflg.
(Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart / 1974)

2) BARENSEN u. HERMENS
Cellular proliferation patterns in an
experimental rhabdomyosarcom in the rat
(European J. Canc. 3; 361-369 / 1967)

3) BASTERT, Gunter
Heterotransplantat menschlicher Tumoren, vorzugsweise
Mamma-Ca. auf thymusaplastische nu-nu-Mäuse.
Ein wissenschaftliches und klinisches Testmodell
Habil.-Arbeit / 1976

4) BERENBAUM, M. C.; SHEARD, J. R.
The growth of human tumours in immunsuppressed mice and
their response to chemotherapy
(Brit. J. Canc. 30, 13 / 1974)

5) BIESELE, J. J.
Assay of carcinolytic and carcinostatic agents
(Ann. N. Y. Acad. Sc. 58, 1129 / 1954)

6) CONSTANZI, J. J.; LONKAS, D.; GAGLIANO, R.G.; GRIFFITH, C.
Intravenous Bleomycininfusion as a potential synchronizing
agent in human disseminated malignancies
(Canc. Res. 38, 1503 / 1976)

7) DENEKAMP, J.
Changes in the rate of repopulation during multifraction
irradiation of mouseskin
(Brit. J. Rad. 46, 381-87 / 1972)

8) DENEKAMP, J.
The response of a mouse sarcoma to single und divided
doses of x-rays and fast neutrons
(Brit. J. Canc. 29, 292-299 / 1974)

9) DESAI, L. J.
Effects of Bleomycin on cells in culture:
a quantitative cytochemical study
(Canc. Res. 34, 1873 / 1974)

10) FLANGAN, S. P.
"nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse
(Genetic Res. 8, 295 / 1966)

11) GANZER, U.
Zellkinetische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Cytostaticums Bleomycin
(Laryng. - Rhinol. 57, 177-186 - Thieme-Verlag / 1978)

12) GELLHORN; PETERSEN; KELLS; HIRSCHBERG; MURRAY
The effects of 6-mercaptopurine, 8-azaguanine and 1,4, dimethane-sulfonyloxy-butane on an experimental brain tumor
(Ann. N. Y. Acad. Sc. 60, 272 / 1954

13) GIOVANELLA, B. C.
Heterotransplantation of human malignant tumours in nude thymusless mice
(J. Nat. Canc. Inst. 51, 615 / 1973

14) HAIR, J.
The morphogenesis of thymus in nude und normale mice
(Proc. of the 1st international workshop on nude mice)
(Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart)

15) HANDLER, A. M.; DAVIES, S.; SOMMERS, S. C.
Heterotransplantation experiments with human cancers
(Canc. Res. 16 / 1956)

16) HITTELMANN, W. N.; RAO, P. N.
Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and it' s relationship to cellulary deprogression in Cho-cells
(Canc. Res. 34, 3433 / 1974

17) KELLERER, A.; HUG, O.
Zur Kinetik der Strahlenwirkung
(Biophysik 1, 33-50 / 1963)

18) KOVACS, C. J.; HOPKINS, H. A.; EVANS, M. J.; LOONEY, W. B.
Effects of 5-FU on the cell kinetics and growth parameters of hepatoma 3924 A
(Brit. J. Canc. 32, 42 / 1975)

19) LINDENBERGER, J.; GANZER, U.
Heterotransplantation of human adenoid cystic carcinoma on thymusaplastic nude mice
(Arch. Oto-Rhino-Laryng. 215, 179-181 / 1977)

20) LINDENBERGER, J.; GANZER, U.; FORTMEYER, H. P.
Die Heterotransplantation bösartiger Kopf- und Halsgeschwülste auf thymusaplastische nackte Mäuse
(Arch. Oto-Rhino-Laryng. 220, 117-128 / 1978)

21) LINDENBERGER, J.
Aspects of xenograftet tumors of the ear, nose and throat
erschienen in G. Bastert et al. (Eds.)
Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology
(Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart / 1981)

22) LOONEY, W.B.; SCHAFFNER, J.G.; KOVACS, C.J.; HOPKINS, H.A.
Solid tumour models for the assessment of different treatment modalities:
Systematics of response to radiotherapy and chemotherapy
(Proc. Nat. Sci. USA 73, 818-822 / 1976

23) LOONEY, W. B.; MAYO, A. A.
A mathematical evaluation of tumour growth curves in rapid, intermediate and slow growing rat hepatoma
(Brit. J. Canc. 27, 341-343 / 1973)

24) MAEDA, M.; SUIT, H. D.
Radiation dose fractionation and oxygen effect in a mammary carcinoma of the C 3 H - mouse
(Communication at the XIth Int. Congr. of Radiology, Roma Int. Congr. Series 89, Excerpta Medica Foundation Abst. N. 980 / 1965)

25) MAURER, W.; SCHULZE, B.
Überblick über die autoradiographischen Methoden und Ergebnisse zur Bestimmung von Generationszeiten und Teilphasen von tierischen Zellen mit markiertem Thymidin
(Acta Histochem. Suppl. 8, 73-87 / 1968)

26) MORRIS, H. P.; WAGNER, B.
Introduction and transplantation of rat hepatoma with different growth-rates
(Methode in Cancer Res. Ed. H. Bush, N. Y.: Academy Press p. 125 / 1968)

27) M^{c} NALLEY, N. J.
A comparison of the effects of radiation on tumour growth delay and cell survival. The effect of oxygen
(Brit. J. Radiol. 46, 450-455 / 1973)

28) Mc KALLEY, N. J.
The effect of radiation on tumour growth delay, cell survival and cure of the animal using a single tumour system
(Brit. J. Radiol. 50, 321-328 / 1977)

29) NENSA, R.
Die Verteilung DNA-synthetisierender Zellen in der Peripherie menschlicher Oro-Pharyngs-Carcinome und in ihren Heterotransplantaten auf der thymusaplastischen nacken Maus
(Dissertation Universität Düsseldorf 1979)

30) PANTELOURIS, E. M.
Absence of thymus in a mouse mutant
(Nature, London 217, 370 / 1968)

31) van PUTTEN, L. M.
Tumour reoxygenation during fractionated radiotherapy. Studies with a transplanted mous e osteosarcoma
(Europ. J. Canc. 4, 173-182 / 1968)

32) ROCKWELL, S.; KALLMAN, R. F.
Growth and cell population of single and multiple KHT-sarcoma
(Cell Tissue Kinetics 5, 449-457 / 1972)

33) RYGAARD, J.; POVLSEN, C. O.
Heterotransplantation of human malignant tumours to a mouse mutant nude
(Acta Path. Microbiol. Scan. 77, 758 / 1969

34) RYGAARD, J.; POVLSEN, C. O.
Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations
(Acta Path. Microbriolog. Scan. Section A / 1971

35) RYGAARD, J.; POLVSEN, C. O.
Heterotransplantation of human epidermoid carcinoma to the mouse mutant "nude"
(Acta Path. Microbiolog. Scan. 80, 713 / 1972

36) SCHLECHTWEG, Kurt
Dissertationsarbeit:- Zeitfaktoruntersuchungen der Strahlenwirkung auf das Harding-Passey-Melanom der Maus
(Universität München 1978)

37) STEEL, G. G.; ADAMS, K.; BARRETT, J. C.
Analysis of the cell population kinetics of transplanted tumours of widely-differing growth rates
(Brit. J. Canc. 20, 278 / 1966)

38) STILES, Chr.; DESMOND, W.; LORRAINE, M.
Growth control of heterologous tissue culture cells in the congenitally athymic nude mouse
(Canc. Res. 36, 1353-60 / 1976

39) TANNOCK, F.
The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour
(Brit. J. Canc. 22, 258-273 / 1968

40) THOMLINSON, R. H.; CRADDOCK, E. A.
The growth response of an experimental tumour to single doses of x-rays
(Brit. J. Canc. 21, 108-125 / 1967

41) THOMLINSON, R. H.; GRAY, L. H.
The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy
(Brit. J. Canc. 9, 539-549 / 1955

42) VIETTI, T.; EGGERDING, F.; VALERIOTE, F.
Combined effect of x-radiation and 5-FU on survival of transplanted leucaemic cells
(J. Nat. Canc. Inst. 47, 865 / 1971)

43) VIETEN, H.; JENSEN, F.
Handbuch der Med. Radiologie, Bd. I/2 (S. 27-30/82-85)

44) VOLM, M; KAUFMANN, HINDERER; GOERTLER
Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cytostatica. (1956)

Lebenslauf

Am 6. April 1954 wurde ich als Sohn des DB-Beamten Werner Affeldt und seiner Frau Gisela geborene Brandenberg in Duisburg geboren. Von April 1961 bis Mai 1965 besuchte ich die Boehle-Schule in Frankfurt (M)-Griesheim. Im Juni 1965 wurde ich in das Leibniz-Gymnasium zu Ffm-Hoechst aufgenommen, wo ich im Mai 1973 die Reifeprüfung bestand.

Im Oktober 1973 nahm ich dann das Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt (M) auf. Zum Wintersemester 1976 wechselte ich an die Universität Düsseldorf und legte dort am 15. April 1980 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Am 22. Mai 1980 wurde mir daraufhin die Approbation erteilt.

Zur Zeit leiste ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr in Bremen ab, den ich voraussichtlich zum 30. September 1981 beenden werde.

Lebenslauf

Am 10. Januar 1952 wurde ich als erstes Kind des damaligen Stadtarztes Dr. med. Albert Kurth und seiner Frau Margarethe geborene Smuda in Dortmund geboren. Meine Einschulung erfolgte 1958. 1961 verzog ich mit meinen Eltern nach Moers / Ndrrh. Dort besuchte ich ab 1962 das Staatl. Gymnasium Adolfinum, an welchem ich 1970 das Abitur ablegte. Im gleichen Jahr begann ich in einer Moerser Apotheke eine Ausbildung als Apothekerpraktikant, die ich 1972 in Düsseldorf mit dem pharmazeutischen Vorexamen abschloß.

Seit dem Sommersemester 1974 studierte ich an der Universität Düsseldorf Medizin. Im Mai 1980 legte ich das Staatsexamen ab und erhielt im Juni 1980 die Approbation. Von September 1980 bis Januar 1981 war ich als Assistenzarzt an der Rheinischen Landesklinik für Psychiatrie und Neurologie Bedburg-Hau tätig.

Am 2. 2. 1981 bin ich zur Bundeswehr einberufen worden und verrichte meinen 15-monatigen Grundwehrdienst als Stabsarzt in Rendsburg / Schleswig-Holstein.

Danksagung

Unser Dank gilt Herrn Professor Dr. med. K. H. Vosteen, Leitender Direktor der Universitäts-HNO-Klinik Düsseldorf, für die Überlassung des Themas.
Zu großem Dank verpflichtet sind wir Herrn Dr. med. J. Lindenberger für die großzügige Hilfestellung und wissenschaftliche Betreuung.
Ebenfalls herzlich gedankt sei Frau M. Jansen für die Erstellung des photografischen Materials.
Dankbare Erwähnung gebührt auch der große persönliche Einsatz von Frau A. Tetzlaff bei der technischen Erstellung (Drucklegung etc.).